

がACC合成酵素の作用によって生成されることが明らかになった (YangおよびHofman、1984)。従って、エチレン合成は、ACC合成酵素およびACCオキシダーゼにより調節される。

他方、植物のエチレン応答におけるシグナル伝達機構を説明する多くの知見が、エチレン応答について欠陥を有するシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 変異体を使用した遺伝学的アプローチから得られている (Ecker、1995; BleeckerおよびSchaller、1996; Chang、1996)。多くのシロイヌナズナのエチレン不感受性の変異体および恒常的エチレン応答性の変異体が単離されてきた。これらの単離は、エチレンで処置した黄化芽生えの、「トリプル応答」(下胚軸の肥大、下胚軸および根の伸張の阻害、ならびに下胚軸および根の放射状の肥大)として知られる形態学的変化に基づく。各変異に対応するいくつかの遺伝子(例えば、ETR1、CTR1、EIN1~3、およびEIL1~3)が同定されている。以下に説明するように、これらの遺伝子解析に基づいて、シロイヌナズナにおけるエチレンシグナル伝達系のモデルが提唱されている(図1; ここで、ERSは、アラビドプシスのETR1ホモログである)。

ETR1 (ethylene resistant 1) の4つの変異対立遺伝子 (etr-1~etr-4) は全て、エチレン不感受性を与え、そして野生型対立遺伝子に対して優性である。ETR1遺伝子産物は、細菌二成分制御系の応答制御因子と著しく類似性を有する配列を含む (Changら、1993)。ETR1を発現するトランスジェニック酵母は、エチレンに結合することが示されており、このことは植物におけるエチレンレセプターとしてのETR1の機能を示唆する (SchallerおよびBleecker、1995)。

etr1変異体とは対照的に、CTR1 (constitutive triple response 1) 遺伝子座における変異は、恒常的なエチレン応答を導き、CTR-1がエチレンシグナル伝達の負の制御因子であることを示す。CTR1遺伝子はETR1遺伝子に対して上位であり、そしてRafキナーゼに相同性を有するタンパク質をコードする (Kieberら、1993)。最近、CTR1はETR1と直接的に相互作用することが見出されている (Clarkら、

1998)。これらの発見により、エチレン応答を誘起する活性が、基底レベルで植物中に通常存在し、ならびに活性は、CTR1を介してタンパク質をリン酸化することにより抑制され、およびETR1に対するエチレン結合により抑制が解除されるといふ構図が考えられた。

5 Chaoら (Chaoら、1997) によってクローニングされた、第3の遺伝子であるEIN3 (ethylene insensitive 3) は、ETR1およびCTR1に対して遺伝学的に上位にあり、現時点で遺伝子経路の最も下流に存在する。etr1と同様に、ein3変異体は、トリプル応答によって表されるエチレン応答についての機能欠失 (loss-of-function) 表現型を示す (Romanら、1995; Chaoら、1997)。EIN3によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、データベースにおける他のアミノ酸配列に  
10 有意な相同性を有さないことが示されている。

Chaoらはまた、EIN3関連産物 (EIL1~EIL3) をコードするcDNAを単離した。EIL (EIN-like) は、EIN3のN末端側半分に有意な相同性を有し、そしてこれらのcDNA (すなわち、EIL1およびEIL2) の発現がEIN3と同様にein3変異を相補し得る。  
15 従って、EILとEIN3とは、互いに機能的に類似するようである (Chaoら、1997)。EIN3およびEIL1は、シロイヌナズナのプロトプラストにおいてGUSレポーターとの融合タンパク質として発現させた場合、もっぱら核に局在した。このことは、これらのタンパク質が転写因子である可能性を示唆する (Chaoら、1997) が、未だその機能は明らかではない。これらが実際に転写因子である場合、その標的遺伝子に興味を持たれる。エチレンシグナル伝達がどのように種々の結果に作用する  
20 のかを理解するためには、EIN3およびEILのさらなる特徴づけが必要とされる。

上述のストレスエチレンの局面において、エチレンは、サリチル酸 (SA) およびジャスモン酸 (JA) と同様に、植物が病原体感染などのストレスを受けた際に合成される二次シグナル物質として知られている。これらの二次シグナル物質が  
25 合成されると、植物内においてストレスを防御する機能を導くストレス抵抗性遺伝子の発現が誘導される。ストレス抵抗性遺伝子の例として、感染特異的 (PR)

遺伝子が挙げられる。

PR遺伝子によりコードされるタンパク質（PRタンパク質）は、種々の防御機能を有することが報告されている。PRタンパク質は、一般に、等電点が酸性側にある酸性PRタンパク質、および等電点が塩基性側にある塩基性PRタンパク質の2つのタイプに分類される。酸性PRタンパク質は、サリチル酸により誘導されることが知られており、植物の病原体感染に対する全身獲得抵抗性（SAR）に関与すると考えられている。塩基性PRタンパク質は、根および下位葉において恒常的に発現する。植物が病原体感染および傷ストレスのようなストレス環境下にさらされる場合、タバコの塩基性PRタンパク質、たとえばPR-2、3、5は、エチレンによって、またPR-1、2、3、5、6は、ジャスモン酸によって誘導されることが報告されている。

エチレン応答のシグナル伝達経路に関与する因子は、上述のように、現在までにいくつか単離されている。しかし、これらの因子が、ストレス抵抗性遺伝子（例えば、塩基性PR遺伝子）の発現に作用するのか否かは明らかではない。

エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子が同定されれば、転写因子の植物体内における発現レベルを調節して、標的遺伝子であるエチレン誘導性遺伝子の発現を制御することが可能であると考えられる。また、標的遺伝子がストレス抵抗性遺伝子である場合、この遺伝子の発現を調節することにより、植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与することが可能であると考えられる。環境ストレスに対する抵抗性を有する植物を作出することは、特に、農業の分野において重要な課題である。

#### 発明の開示

本発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子を提供することにある。本発明のさらなる目的は、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子の植物

体内における発現レベルを調節することにより、環境ストレス（例えば、病害体感染および傷ストレス）に対して抵抗性が付与された植物を作出する方法を提供することにある。本発明の他の目的は、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をスクリーニングする方法を提供することにある。

5           本発明は、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子であって、コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して特異的な結合活性を有する、転写因子に関する。

1つの実施態様において、上記の転写因子は、以下の（a）または（b）である：

10           （a）配列表の配列番号2の82位のGluから302位のArgまでのアミノ酸、および配列番号2の482位のValから615位のTyrまでのアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、転写因子；または

15           （b）アミノ酸配列（a）において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子。

1つの実施態様において、上記の転写因子は、以下の（c）または（d）である：

          （c）配列表の配列番号2の1位のMetから615位のTyrまでのアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する転写因子；または

20           （d）アミノ酸配列（c）において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子。

1つの実施態様において、上記の転写因子は、傷誘導性遺伝子の発現を制御する。

25           1つの実施態様において、上記のエチレン誘導性遺伝子群は、塩基性PR遺伝子群を含む。

1つの実施態様において、上記の塩基性PR遺伝子群は、塩基性PR-2遺伝子および塩基性PR-5遺伝子を含む。

また、本発明は、上記の転写因子をコードする遺伝子に関する。

さらに、本発明は、以下の(i)または(ii)のDNAからなる、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードする遺伝子に関する：

(i) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA；または

(ii) 塩基配列(i)を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードするDNA。

さらに、本発明は、上記の遺伝子を含むポリヌクレオチドで、植物細胞を形質転換する工程；および、この形質転換した植物細胞を再分化させて、植物を得る工程を包含する、植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与する方法に関する。

1つの実施態様において、上記のポリヌクレオチドは配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAを含む。

1つの実施態様において、上記の環境ストレスは病原体感染を含む。

1つの実施態様において、上記の環境ストレスは傷ストレスを含む。

さらに、本発明は、コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して特異的な結合活性を有するタンパク質を同定する工程を包含する、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をスクリーニングする方法に関する。

## 図面の簡単な説明

図1は、シロイヌナズナにおけるエチレン応答経路を模式的に示す図である。

図2は、TEILのヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を示す図である。推定されるアミノ酸配列を、TEIL cDNAのヌクレオチド配列の下に示す。三角は、酵母ワンハイブリッドスクリーニングにより単離された元のクローンの5'末端の位置を示す。予測される $\alpha$ -螺旋構造に下線を付す。

図3は、TEIL、EIN3、およびEIL1ポリペプチドの間のアミノ酸配列の比較を

示す図である。黒のボックスで囲った白字部分は、TEIL、EIN3、およびEIL1の全  
てにおいてアミノ酸が同一であることを示す。

図4は、TEILのDNA結合領域の解析を示す図および写真である。図4Aは、T  
EILタンパク質の欠失変異体を模式的に示す。一連のN末端欠失変異タンパク質  
5 (ΔN1～ΔN4)、またはC末端欠失変異タンパク質 (ΔC1～ΔC3) および完全長  
のTEIL (WT) をTrx (チオレドキシン) との融合体として作製した。図4Bは、T  
EIL欠失変異体を用いた電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) の結果を示す。  
約50ngのTrxとTEIL欠失変異体との融合タンパク質を、<sup>32</sup>P標識したobs1プローブ  
とともにインキュベートした。

10 図5は、TEILタンパク質の結合配列の至適化を示す図である。TEILのコンセ  
ンサス結合配列を、random binding site selection法により決定した。Trx-TEI  
Lタンパク質を、ランダムな18マーの配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドとと  
もにインキュベートした。DNA/タンパク質複合体をアクリルアミドゲル電気泳動  
により分離し、そして回収したDNAを、次の回の選択のためにPCRにより増幅した。  
15 4回の選択後、増幅したDNAをプラスミド中にクローン化し、そして配列決定し  
た。図5Aは配列決定され、至適化された結合配列を与えるようにアラインされ  
た87個のTEIL結合部位を示す。ランダムに選択した39個の配列のTEIL結合親和性  
を、はじめの39個の配列の右側に相対値で示した。最も高い値を100として示し、  
親和性の強度の順に並べた。図5Bは、TEILのコンセンサス配列の推定の結果を  
20 示す。

図6は、至適化されたTEIL結合配列の変異解析を示す図および写真である。  
図6Aは、最も高い結合親和性を有するobs1の配列、ならびにその変異配列であ  
るobs2およびobsml～5の配列を示す。太字は、TEILのコンセンサス配列を示す。  
下線は、変異されたヌクレオチドを示す。小文字は隣接領域を示す。図6Bは、  
25 変異オリゴヌクレオチドプローブを用いる電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA  
) の結果を示す。図6Aにおいて示される配列を有するオリゴヌクレオチドを、

<sup>32</sup>Pで標識し、そして組換えTrx-TEILタンパク質とともにインキュベートした。p  
slは、タバコPR1aのプロモーターにおける結合配列である。

図7は、エチレン処理したタバコの葉における増加したtebs結合活性を示す、  
電気泳動写真である。エチレン処理したタバコの葉（レーン2～8）または、未  
5 処理のタバコの葉（レーン1）から調製した核抽出物（3 μg）を、<sup>32</sup>P標識した  
4コピーのobs1配列を含むDNAプローブとともに混合した。続いて、25倍モル過  
剰および125倍モル過剰の、obs1の二本鎖オリゴヌクレオチド（レーン3および  
4）、obsm2の二本鎖オリゴヌクレオチド（レーン5および6）、およびobsm3の  
二本鎖オリゴヌクレオチド（レーン7および8）を、TEIL-プローブDNA結合反応  
10 に対する拮抗DNAとして添加した。

図8は、TEIL遺伝子の転写産物の組織特異的蓄積および傷誘導性蓄積を示す  
ノザンプロット解析の結果を示す、電気泳動写真である。図8Aは、上欄に示す  
組織または細胞から単離したRNAについての結果を示す。図8Bは、小片に切断  
して、示した期間、水とともにインキュベートした成熟葉から単離したRNAにつ  
いての結果を示す。全RNA（20 μg）をロードし、TEILのC末端領域に相当するcd  
15 NA断片（pGAD-TEILクローンをDraIおよびBamHIで切断して得られる断片）をプロ  
ーブとして転写産物を検出した。各レーンのRNAが等量ずつゲルにロードされて  
いることを、エチジウムブロミド（EtBr）により確認した。

図9は、tebs-レポーター遺伝子のタバコプロトプラストにおける活性化お  
20 よびTEIL過剰発現によるトランス活性化を示すグラフである。一過性発現アッセ  
イを、タバコ葉肉細胞プロトプラストを用いて行った。レポータープラスミドは、  
CaMV 35S RNA minimalプロモーターとGUS遺伝子との融合遺伝子からなり、4コ  
ピーのobs1（obs1-GUS）または4コピーのobsm2（obsm2-GUS）を含んだ。エフェク  
タープラスミド（35S-TEIL）は、CaMV35Sプロモーターの制御下にTEILcDNAを含  
25 んだ。コントロールエフェクター（35S-NPTII）は、TEIL cDNAの代わりにNPTII  
コード配列を含んだ。5 μgずつのレポータープラスミドとコントロールエフェ

クタープラスミド (35S-NPTII) とを (白いカラム) 、またはレポータープラスミドとエフェクタープラスミド (35S-TEIL) (黒いカラム) とを、エレクトロポレーションによりトランスフェクトした。48時間培養した後、GUS活性を測定した。グラフは、それぞれ、6回測定した平均値およびその標準偏差を示す。

- 5            図10は、TEILを過剰生産する3個体の形質転換タバコ植物 (35S-TEIL-2、35S-TEIL-10および35S-TEIL-14系統) において、TEIL遺伝子 (teil) の発現および塩基性PR遺伝子 (PR-5およびPR-2) の発現が活性化されていることを示す、ノザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。コントロールとして用いた、非形質転換タバコの無傷の葉 (SNN) および傷をつけた1日後の葉 (SNN-wound)
- 10            についての結果も併せて示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明をより具体的に説明する。なお、本明細書中に言及した参考文献については、後段にその詳細を一覧して示す。

- 15            本発明者らは、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する新規な転写因子を見出した。本発明者らは、この転写因子が、(1) 植物がエチレンでの処理および傷を受けた際に誘導性であること、および(2) 配列特異的なDNA結合活性を有する転写因子として機能して、エチレン誘導性遺伝子および傷誘導性遺伝子の発現を調節し得ること、を解明した。本発明は、これらの知見に基づいて完成された。
- 20            した。

#### (1) 本発明の転写因子および転写因子をコードする遺伝子

本明細書において、「エチレン誘導性遺伝子群」とは、植物体内でのエチレンの発生により、その発現が誘導される複数の遺伝子からなる一群をいう。エチレン誘導性遺伝子に属する遺伝子としては、塩基性PR遺伝子などが挙げられる。

- 25            「塩基性感染特異的 (PR) 遺伝子群」とは、植物が病原体感染および傷ストレスなどの環境ストレス下に曝された場合に活性化される複数の遺伝子からなる一



群をいう。塩基性PR遺伝子の例としては、抗カビ性機能を有するタンパク質をコードする塩基性PR-1遺伝子、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼをコードする塩基性PR-2遺伝子（例えば、GLA、GLB、およびgn1）、クラスI、IIキチナーゼをコードする塩基性PR-3遺伝子（例えば、CHN48、CHN50、CH5B、およびATHCHTB）、クラスVキチナーゼをコードする塩基性PR-4遺伝子、オスモチンをコードする塩基性PR-5遺伝子、プロテイナーゼインヒビター（PI）をコードする塩基性PR-6遺伝子（例えば、NT PROTINHおよびSTP12G）などが挙げられる（例えば、Lc van Loonら、1994を参照）。

遺伝子についての「発現」とは、DNAのmRNAへの転写をいう。mRNAへの転写の程度を発現レベルとして示す。従って、転写が抑制される場合は発現レベルが減少し、転写が促進される場合は発現レベルが増大する。

「転写因子」とは、転写反応において、RNAポリメラーゼ以外に必要とされるタンパク質性因子である。真核細胞においては、正しい転写反応が起こるためには、RNAポリメラーゼ以外に、転写因子が必要である。転写因子としては、DNAに直接結合することにより作用するもの、および因子間のタンパク質-タンパク質相互作用を介して機能するものが挙げられる。

本発明において意図される転写因子は、コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して配列特異的なDNA結合活性を有する転写因子である。ここで、括弧は、括弧内の斜線により区分される2つの塩基のいずれかが選択されることを意味する。ここで、斜線により区分される2つの塩基がともに大文字で表される場合は、使用され得る適切性が等しいことを意味する。また、片方の塩基が小文字で表される場合、コンセンサス配列において使用され得るものの、その適切性が他方の塩基に比べて低いことを意味する。

以下は、本発明において意図される転写因子である：

(a) 配列表の配列番号2の82位のGluから302位のArgまでのアミノ酸、および配列番号2の482位のValから615位のTyrまでのアミノ酸を含むアミノ酸配列を有

する、転写因子（このアミノ酸配列は、好ましくは、1位のMetから302位のArg、または82位のGluから412位のSer、より好ましくは、1位のMetから412位のSerまでを含む）；

5 (b) アミノ酸配列（a）において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子（（a）の変異体）；

(c) 配列表の配列番号2の1位のMetから615位のTyrまでのアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する転写因子；および

10 (d) アミノ酸配列（c）において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子（（c）の変異体）。

本発明の転写因子は、好ましくは、（a）の転写因子またはその変異体であり、より好ましくは、（c）の転写因子またはその変異体であり、さらにより好ましくは、（c）の転写因子である。

15 本明細書において、「1またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、または付加」とは、部位特異的突然変異により導入できる程度の数の欠失、置換、または付加をいう。上記のような変異は、天然に生じるか、または変異原物質の作用によって、もしくは人為的に部位特異的突然変異の導入を用いて生じさせ得る。部位特異的突然変異の手法は、当該分野では周知である。例えば、ZollerおよびSmit  
20 h（1982）を参照。

DNAに直接結合することにより作用するタイプの転写因子は、結合する標的遺伝子のプロモーター上の、特定のDNA配列に対して高い選択性を有する。この選択性と同一の、または同程度に高い選択性が認められるとき、DNA配列への結合は「特異的」であるという。従って、上記の転写因子と、対応する特定のDNA配  
25 列との間の結合は特異的である。同様に、その転写因子の変異体であって結合活性を維持しているものも、同じDNA配列に対して特異的に結合する。ある転写因

子がDNA配列に対して特異的な結合活性を有するか否かは、例えば、<sup>32</sup>Pで標識したDNA配列と転写因子とを適切な時間インキュベートした後、常法に従って電気泳動度シフトアッセイ (EMSA) を行うことにより確認され得る。DNA-タンパク質複合体の形成が観察される場合、転写因子は、そのDNA配列に対して「特異的な結合活性を有する」という。

5 コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して特異的な結合活性を有するタンパク質は、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子として使用され得る。従って、コンセンサス配列を利用して、新規な転写因子をスクリーニングする方法も、本発明の範囲に含まれる。コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CT  
10 に特異的な結合活性を有する転写因子を同定し単離する方法としては、例えば、DNA結合アフィニティーカラムにより植物細胞核分画物を精製する方法、酵母ワンハイブリッド系を用いる方法、および直接放射性標識した、コンセンサス配列を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ライブラリー（例えば、λgt11ライブラリーのような発現ライブラリー）をスクリーニングするサウス-ウ  
15 エスタン法などが挙げられる。

本発明の転写因子をコードする遺伝子は、本発明において意図される遺伝子である。新規な転写因子が得られたとき、それをコードする天然由来の遺伝子を単離する方法としては、例えば、上述のサウス-ウエスタン法を用いる、ライブラリーのスクリーニングが挙げられる。この方法を用いることにより、直接cDNAを  
20 単離することができる。目的の遺伝子を単離するための遺伝子ライブラリーの作製法、ライブラリーからメンブレンに転写されたタンパク質とプローブDNAとの結合反応条件、および遺伝子のクローニング法は当業者に周知である。例えば、Maniatisら（1989）を参照。

本発明の転写因子をコードする遺伝子としては、天然由来の遺伝子だけでなく、  
25 人工的に合成した遺伝子も用い得る。

配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有するDNAからなる遺伝子、および

配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードする DNA からなる遺伝子は、本発明において意図される遺伝子である。当業者は、所望の本発明の転写因子をコードする遺伝子を容易に選択することができる。

本明細書中で使用する用語「ストリンジェントな条件」とは、特異的な配列にはハイブリダイズするが、非特異的な配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件の設定は、当業者に周知であり、例えば、Maniatis ら (1989) に記載される。本明細書において特に意図されるストリンジェントな条件は、次の条件に代表される：プローブを含んだハイブリダイゼーション溶液 {5 × SSC (75mM クエン酸三ナトリウム、750mM 塩化ナトリウム)、1% SDS、1 × Denhardt 液 (0.2% BSA、0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% Ficoll 400) } 中で、65℃ で 1 夜インキュベーション後、0.2 × SSC - 0.1% SDS 溶液で 65℃、30 ~ 60 分洗浄を行う条件。

得られた転写因子が、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御するか否かは、この転写因子を恒常的に発現する形質転換植物を作出し、植物におけるエチレン誘導性遺伝子の発現について (例えば、ノザンプロットによる) 解析を行うことにより確認し得る。本発明において、エチレン誘導性遺伝子の発現が、非形質転換植物における発現に比べて有意に増強される場合、その転写因子はエチレン誘導性遺伝子群の「発現を制御する」という。

本発明において、特に好ましい転写因子は、TEIL (Tobacco EIN3-like) である。このタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) および TEIL をコードする遺伝子の cDNA 配列 (配列番号 1) を図 2 に示す。

## (2) TEIL タンパク質の構造および機能

本発明の転写因子である、TEIL タンパク質のアミノ酸配列は、EIN3 および EIL1 アミノ酸配列の残基 80 ~ 300 にわたるアミノ末端側半分の領域と、92% の配列同一

性を共有する（実施例1）。本明細書において、アミノ酸配列についての配列同一性とは、代表的にはGeneWorks software IntelliGenetics, Inc. (Smith & Watermanの方法に基づく) において使用される条件下で決定されるものをいう。上記の領域はまた、EIN3およびEILタンパク質ファミリー (EIL1~3) 間で、60~89%の同一性を共有しており、高度に保存されている。このことは、N末端領域の必要不可欠な機能を示唆する。保存された領域は、本発明におけるDNA結合ドメインの局在分析において示されるように、主にDNA結合活性を有するようである。公知の転写因子のDNA結合ドメインは、それらのファミリー間および種間で保存されており、そして同一のまたは類似のDNA配列を認識する。TEILとEIN3およびEIL1~3との間に見られる、DNA結合活性を有すると推定される領域における高い類似性は、EIN3またはEIL1~3により認識されるDNA配列が、TEILにより認識されるDNA配列に同一であるかまたは高度に類似することを示唆する。この示唆は、EIN3に対してTEILよりも低い類似性を示すEIL2であっても、EIN3およびEIL1と同様にein3変異を相補できる (Chaoら、1997) ことから支持される。

DNA結合のために必要と推定されるTEILのアミノ酸配列は、公知のDNA結合モチーフを含まない。このアミノ酸配列はまた、コンピューター分析により、 $\alpha$ -螺旋構造に富む領域を含むことが予測される (図2)。この分析は、The Predict Protein server (<http://dodo.cpmc.columbia.edu/predictprotein/> (Rost & Sangerの方法に基づく)) を用いて行った。Chaoらによって推論されるように、この螺旋構造は、EIN3およびEIL1~3にもまた存在し、DNA結合に関与するとともに、ホモダイマーまたはヘテロダイマー形成を含むタンパク質-タンパク質相互作用に関与し得る。転写因子GT-1およびGT-2は、2つの短いループによって分けられる3つの $\alpha$ 螺旋 (これは、高等植物に特有である) からなる三重螺旋DNA結合ドメインを有することが報告されている (Deheshら、1992; Gilmartinら、1992)。

さらに、EIN3の塩基性ドメインIおよびIIに対応する、保存された塩基性アミノ酸の2つのクラスターが、TEILのN末端において見出される (TEILのアミノ酸

残基54～67および90～96)。これらのドメインを含む領域の欠失は、DNA結合活性の完全な欠損を導くので、 $\alpha$ 螺旋および塩基性ドメインは新規なDNA結合ドメインを構成するようである。TEILのDNA結合ドメインの別の顕著な特徴は、広範な領域がDNA結合の完全な活性のために必要とされ得ることである。C末端からの203個のアミノ酸残基の除去は、一定の結合活性の減少を生じる（実施例2）。このことは、TEIL配列の残基1～412から伸張される領域全体が、完全なDNA結合活性に必要であり得ることを示す。あるいは、C末端領域に、N末端側の結合ドメインの作用と協調して作用する第2のDNA結合領域が存在するのかもしれない。

TEILの至適化したDNA結合配列は、A(T/C)G(A/T)A(C/T)CTである（実施例3）。この認識配列は、公知の植物転写因子が認識する配列には見出されない独特なものである。発生調節に参与する哺乳動物転写因子である、Oct-1のコンセンサス結合配列(ATGCAAT)およびPit-1のコンセンサス結合配列(ATGNATAA)；ここでNは任意の塩基を、およびWはAもしくはTのいずれかを表す（HerrおよびCleary, 1995）は、上記の認識配列に類似性を有する。これらの哺乳動物転写因子は、POU特異的ドメインおよびPOUホメオドメインの2つの構造的に独立したセグメントからなるPOU DNA結合ドメインを含む。POU特異的ドメインおよびPOUホメオドメインは、それぞれ、4個のおよび3個の $\alpha$ 螺旋からなる。POU DNA結合ドメインとTEILとの間には、アミノ酸配列についての類似性は見出されない。しかし、DNA結合活性を有するTEILのN末端領域が、上述したようにいくつかの予測される $\alpha$ 螺旋を形成することは注目すべきである。

TEILは、EIN3に機能的に類似する。EIN3との配列同一性がわずか35%であるEIL2でさえ、EIL1と同様に、ein3変異を相補できる。従って、EIN3に対してより高い類似性を有するTEILもまた、ein3変異を相補できると考えられる。

EIN3またはEIL1 cDNAを過剰発現するシロイヌナズナの芽生えは、エチレン応答経路の活性化の指標となる、恒常的なトリプル応答表現型を示す（Chaoら、1997）。このことは、TEILがタバコプロトプラストにおける転写因子として機能す

という本発明者らの観察結果と整合する。トランス活性化は、TEIL結合配列に対するTEILの直接的な結合を介して行われると考えられる。酵母において、TEILをGAL4 DNA結合ドメインとの融合体として発現させた場合、レポーター遺伝子を活性化し得た。このトランス活性化には、少なくともTEILアミノ酸配列の残基482～615の領域が必要とされた（実施例7）。これらは、TEILが、配列特異的なDNA結合能力および転写活性能力を有する転写因子であることを示す。

TEILの転写活性化機能は、エチレン認識からのシグナル伝達により媒介されるようである。tebs（TEIL結合部位）をプロモーターの上流に連結したレポーター遺伝子は、おそらく内因的に活性化されたTEILまたはその関連タンパク質により、プロトプラストにおいて有意に活性化された（実施例6）。使用したプロトプラストにおいて、ストレス誘導性遺伝子は、おそらくプロトプラストを調製する間に、細胞壁から放出されるか（DavisおよびHahlbrock、1987）または細胞壁消化酵素溶液中のエリシター様因子により、および／またはエチレン放出を誘起する直接的な傷形成の影響（O'Donnellら、1996）により、活性化される。さらに、エチレン処理した葉からの核抽出物は、TEILまたは関連タンパク質に由来する、増強されたtebs結合活性を示した（実施例4）。増強された活性は、健全な組織に元来存在する潜在的な不活性TEILタンパク質のエチレン媒介性の転写後活性化に依存するようである。Chaoら（1997）はまた、EIN3タンパク質のレベルは、エチレン処理により変化されないことを観察している。これらの観察から、TEIL標的遺伝子（tebs含有遺伝子）のエチレン誘導性活性化は、エチレンにより調節されるTEILのDNA結合活性の変化に依存すると考えられる。

### （3）TEILタンパク質の標的遺伝子

ein3変異体において、トリプル応答以外に、グルタチオンSトランスフェラーゼを含むエチレン誘導性タンパク質のいくつかの遺伝子の発現の障害が観察されることが報告されている（Chaoら、1997）。etr1変異体およびetr1-1変異遺伝子を有するタバコ形質転換体において、いくつかの塩基性PRタンパク質はほとんど

産生されない (Lawtonら、1994 ; Romanら、1995) 。反対に、恒常的なエチレン  
応答表現型を示すctrl変異体は、恒常的に塩基性キチナーゼタンパク質 (塩基性  
PR-3遺伝子の発現産物) を産生する (Kieberら、1993) 。これらの知見は、EIN3  
の標的遺伝子が、塩基性PR遺伝子を包含すること、ならびに、EIN3のホモログで  
5 あるTEILの標的遺伝子もまた、塩基性遺伝子を包含することを示唆する。従って、  
塩基性PR遺伝子群を含むエチレン誘導性遺伝子のプロモーター領域が、TEILに対  
する結合部位を含むことが期待された。

本発明者らは、塩基性PR遺伝子のプロモーター領域において、TEILのコンセン  
サス結合配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTと良好な一致を示す配列を見出した (8ヌク  
10 レオチドあたり6ヌクレオチド以上が一致した) 。このうちのいくつかはエチレ  
ン応答性領域内に特定された (表1) 。例えば、タバコ塩基性キチナーゼをコー  
ドするCHN48遺伝子のエチレン誘導は、プロモーター領域における-503~-358に  
わたる領域を必要とする (Shinshiら、1995) 。この領域において、隣接して位  
置する3つの推定のtebs、およびエチレン誘導性発現に必要とされる2つのGCC  
15 ボックス (AGCCGCC) が存在する。CHN50遺伝子の対応する相同領域も、同一また  
は同種の推定のtebs、およびGCCボックスを保存する (表1) 。タバコオスモチ  
ンプロモーターのエチレン応答性領域は、-248~-108の間に位置する小領域に規  
定される (Raghothamaら、1993) 。この領域にも、1つのtebsおよび2つのGCC  
ボックスが存在する。さらに、パセリPR2プロモーター (van de Lochtら、1990  
20 ) の-168~-108の間のエリシター応答性領域内には、3つの推定のtebsが存在す  
る。興味深いことに、この60bp領域はGCCボックスおよび配列(T)TGAC(C)を含ま  
なかった。



表 1

塩基性 PR 遺伝子のプロモータ領域において見出される  
推定のTEIL結合部位 (tebs)

遺伝子名 (種)	配列 (位置 <sup>a</sup> )	GCC ボックス <sup>b</sup>	参考文献
<b>β-1,3- グルカナーゼ (PR2) 遺伝子</b>			
GLA ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	ACGAATAA ( -85 ) ATGTATTT ( -396 ) ATGAAAGT ( -495 ) ATGTAGAT ( -563 )	ATGAATTG ( -639R ) ATGAATCA ( -913R ) ATGAATTT ( -1114 )	-109 -1130 -1162 Sperisen et al., 1991
GLB ( <i>N. tabacum</i> )	ATGTAAAT ( -60R ) ACGAATAA ( -97 ) ATGAAGTT ( -111R ) ATGTACAA ( -195R ) ATGAATAG ( -291R ) ATGAATTT ( -426 )	ATGTACCG ( -709 ) ATGAATTG ( -763R ) ATGAAAAT ( -776R ) ATGAATCC ( -939 ) ATGTAAAT ( -1179R ) ACGTAAGT ( -1274 ) ATGAATTT ( -1299 )	-121 -1315 -1347 Sperisen et al., 1991
gn1 ( <i>N. plumbaginifolia</i> )	ATGAAGCT ( -6R ) ATGAAATT ( -96 ) ATGATCCT ( -140 ) ATGGACAT ( -273 ) ATGAAGTT ( -305 )	ATGAATTA ( -457R ) ATGAACTT ( -484R ) ACGAATTT ( -505 ) ATGTATGT ( -523 ) ATGGACTT ( -544R )	-239 Castresana et al., 1990
<b>キチナーゼ (PR3) 遺伝子</b>			
CHN48 ( <i>N. tabacum</i> )	ATGTAACC ( -415 ) ATGAAGCT ( -487 )	ATGTATTT ( -505R )	-431 -476 Shinshi et al., 1990
CHN50 ( <i>N. tabacum</i> )	ATGAAACT ( -213 ) ATGTACTG ( -610 )	ATGTAACC ( -628 ) ATGAAGCT ( -704 )	-644 -693 van Buuren et al., 1992
CH5B ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	ATGTAAAT ( -372R ) ATGAAGCC ( -619R ) ATGAAGAT ( -639R ) ATGAAATT ( -646 )	ATGAAGTT ( -682 ) ATGTAACT ( -789R ) ATGGATGT ( -817 )	-152 Broglie et al., 1989
ATHCH1B <sup>c</sup> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	ATGAATGT ( -32R ) ATGAAACT ( -242R ) ACGTAGAT ( -343R ) ATGTATAC ( -480R )	ATGCAACT ( -523 ) ATGTATAA ( -545R ) ATGAATAT ( -632R ) ACGAACCC ( -648 )	-640 <sup>d</sup> Samac et al., 1990
<b>プロティナーゼインヒビターII (PR6) 遺伝子</b>			
NTPROTINH ( <i>N. tabacum</i> )	ATGAATTG ( -78 ) ATGTATAG ( -120R ) ATGTACCT ( -174 ) ATGAACCC ( -260R )	ATGGAATT ( -381R ) ATGGACCT ( -445 ) ATGTACCT ( -522 ) ACGTAATA ( -651 )	-549 <sup>d</sup> Balandin et al., 1995
STP12G ( <i>Solanum tuberosum</i> )	ATGAATAA ( -316 ) ATGAATAT ( -631 ) ATGAATTA ( -637R ) ATGAATGC ( -619 )	ATGAATGA ( -762R ) ATGAAAAT ( -833 ) ATGAACAA ( -863R )	none Keil et al., 1986
<b>オスモチン (PR5) 遺伝子</b>			
( <i>N. tabacum</i> )	ATGGATAT ( -67R ) ACGGAATAT ( -109R ) ATGAATAT ( -188R )	ACGAATAT ( -409 ) ATGTACTT ( -521 ) ATGTACTT ( -718 )	-143 <sup>d</sup> -163 Raghothama et al., 1993
<b>塩基性 PR1 遺伝子<sup>c</sup></b>			
( <i>N. tabacum</i> )	ACGGAGCT ( -138 ) ACGAATAT ( -167 ) ATGAACAA ( -216R )	ATGTATAT ( -278 ) ATGTATGT ( -282 )	-186 Payne et al., 1989
<b>パセリ PR2 遺伝子</b>			
( <i>Petroselinum crispum</i> )	ATGAAGTT ( -136 )	ATGAACAT ( -156R ) ATGTATGT ( -159 )	none van de Locht et al., 1990

<sup>a</sup> 転写または翻訳開始点からの tebs の 5'塩基対の位置。

<sup>b</sup> R は逆方向を示す。

<sup>c</sup> いくつかの塩基性 PR 遺伝子において保存される配列 AGCCGCC の位置。

none は GCC box が見出されないことを示す。

<sup>d</sup> 配列の位置を翻訳開始点から測定した。

不完全な GCC ボックス、GCCGCC。

TGACエレメントは、パセリPR1遺伝子 (Despresら、1995)、トウモロコシPRms  
遺伝子 (Raventosら、1995)、およびジャガイモPR-10a遺伝子 (Rushtonら、199  
6) のエリシター応答性に必要であることが示唆されている。一方、TGACエレ  
5      メントは、ストレス応答性遺伝子として知られるPAL (phenylalanine ammonia-ly  
se) 遺伝子ファミリーおよび4CL (4-coumarate:coenzymeA ligase) 遺伝子ファ  
ミリーのプロモーターにおけるエリシター応答性領域中には存在しない。このこ  
とは、これらのストレス応答性遺伝子の調節においては、異なるクラスのエリシ  
ター応答性エレメントおよび転写因子が関与していることを示唆する。パセリPR  
10      2遺伝子のエリシター応答性は、エリシター処理により発生され得るエチレンに  
より媒介され得、そしてエリシター応答性領域において見出される推定のtebsに  
より付与され得る。これらの観察により、TEILについての直接的な標的遺伝子と  
して、多くの塩基性PR遺伝子のメンバーが含まれることが考えられる。この推定  
は、恒常的にTEILを産生する形質転換植物において塩基性PR-2およびPR-5遺伝子  
15      の発現が観察された (実施例9) ことにより支持された。

多くの塩基性PR遺伝子のプロモーター領域は、エチレン誘導性発現に必要とさ  
れるGCCボックスを含む (Ohme-TagakiおよびShinshi、1990; Eyalら、1993; Har  
tら、1993)。GCCボックスに結合するタンパク質である、エチレン応答性エレ  
メント結合タンパク質 (EREBP) は、エチレン誘導性塩基性PR遺伝子の潜在的な調  
20      節因子であることが提唱されている (Ohme-TagakiおよびShinshi、1995)。表1  
において示すように、GCCボックスを含むほとんどの塩基性PRプロモーターにお  
いて、GCCボックスの近くに本発明におけるtebs配列が存在する。特定の理論に  
束縛されるものではないが、TEILは、EREBPと協調して、塩基性PR遺伝子の発現  
を調節し得ると考えられる。従って、塩基性PR遺伝子におけるTEIL結合部位を破  
25      壊すると、GCCボックスの機能欠失 (loss-of-function) 実験における観察 (Se  
ssaら、1995) と同様に、エチレン応答性のいくつかの欠損を導き得る。TEILがE

REBPと直接相互作用して、協調性のトランス活性化機能を達成する可能性もある。

エチレンまたは傷形成によって効果的に誘導される塩基性PR遺伝子とは対照的に、サリチル酸により活性化される酸性PR遺伝子は、TEILの標的ではないかもしれない。しかし、本発明者らは、以下の理由から、TEILが酸性PR遺伝子発現のエチレン媒介性活性化に影響し得るという可能性を、PR-1aプロモーターにおけるp  
5 slの機能欠失分析により確認するまでは排除し得ない：（１）TEILはタバコ酸性PR-1aプロモーターのpsl部位に結合するタンパク質として最初に単離されたこと；（２）酸性PR遺伝子は、サリチル酸で誘導されるが、エチレンおよびサリチル酸、またはエチレンおよびジャスモン酸での処理により、協調的に誘導されるという報告があること；および（３）TEILのpslに対する結合親和性は、至適な結合配列の結合親和性に比べて実質的に低い、多くの遺伝子において規定されたシス作用性エレメントは、それらの同起源の結合因子に対して必ずしも強力な結合部位ではないこと。

本発明のTEILが、エチレン誘導性転写の活性化を媒介する配列特異的DNA結合  
15 タンパク質として機能し得るという知見は、そのホモログであるEIN3およびEIL1～3もまた、TEILと同様にエチレン誘導性転写活性化を媒介する配列特異的DNA結合タンパク質として機能し得ることを示す。各メンバーは、EREBPを含む他のタンパク質との直接的または間接的な相互作用を介して、重複して異なる遺伝子を標的し得る。エチレンは多様な生理学的現象に関与する遺伝子の活性化および抑制を媒介する。しかし、ein3変異体が全てのエチレン媒介性効果において障害され  
20 ないという観察（Romanら、1995）により示唆されるように、いくつかのエチレン応答性遺伝子は、まだ同定されていない転写因子（おそらく、EIN5、EIN6、およびEIN7を含む）により調節されているのかもしれない。

#### （４）形質転換植物の作成

本発明の転写因子をコードする遺伝子は、それを含むポリヌクレオチドとして  
25 植物に導入され得る。ポリヌクレオチドは、通常、遺伝子が作動可能に組み込ま

れた適切な植物発現ベクターの形態である。導入された遺伝子の植物内での発現により、外因的に本発明の転写因子が産生され得る。

以下に詳細に述べるように、植物に遺伝子を導入して形質転換植物を作製する方法は、当該分野における常法に従って実施され得る。

5       本願発明の方法が適用される「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。特に好ましい植物としては、タバコ、ピーマン、ナス、メロン、トマト、サツマイモ、キャベツ、ネギ、ブロッコリー、ニンジン、キウリ、柑橘類、白菜、レタス、モモ、イネ、ジャガイモ、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。また、特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、  
10   植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

      本発明の方法において、転写因子をコードする遺伝子が、対象となる植物と同一種または近縁の種（例えば、同一の属、または同一の科に分類される種）に由来することは、好ましい態様であり得るが、必ずしも必要ではない。  
15

      本発明の方法に用いられる「ポリヌクレオチド」は、本発明の転写因子をコードする遺伝子、および所望の形質転換を達成するために必要な任意の付加的配列を有する。上述のように、このポリヌクレオチドは、代表的には植物発現ベクターである。

20       「植物発現ベクター」とは、目的の遺伝子の発現レベルを調節するプロモーターなどの種々の調節エレメントが、宿主植物細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列の組換え構築物をいう。好適には、植物プロモーター、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子、およびエンハンサーを含み得る。より好適には、複製起点を含み得る。植物発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの好適な種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。当業者は、本発明の実施にあたって、プロモーター、エン  
25

ハンサーなどの調節エレメントを適宜選択することにより、導入される遺伝子の発現の程度を調節し得る。

本発明に用いる植物発現ベクターはさらにT-DNA領域を有し得る。T-DNA領域は、特にアグロバクテリウムを用いて植物を形質転換する場合に遺伝子の導入の効率を高める。

「植物プロモーター」とは、植物細胞において機能し得るプロモーターをいう。例えば、タバコの感染特異的タンパク質PR-1のプロモーター（以下、タバコPR-1プロモーターという）、熱ショックにより誘導されるプロモーターなどの、ある種のストレスにより発現が誘導されるプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35Sプロモーター、ノバリン合成酵素のプロモーター（P<sub>nos</sub>）のような恒常的なプロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現レベルに影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター（T<sub>nos</sub>）、タバコPR-1遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。

「薬剤耐性遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にする遺伝子であることが望ましい。カナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンフォスフトランスフェレーズII（NPTII）遺伝子、およびハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンフォスフトランスフェレーズ遺伝子などが好適に用いられ得る。薬剤耐性遺伝子を発現させるプロモーターの例としては、上記植物プロモーター、例えば、タバコPR-1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、ノバリン合成酵素プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサ

一領域が好適である。エンハンサーは、1つの目的遺伝子について複数個用いられ得る。

植物発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、pBI系のベクター、pUC系のベクターあるいはpTRA系のベクターが好適に用いられ得る。pBI系およびpTRA系のベクターは、アグロバクテリウムを介して植物に目的の遺伝子を導入し得る。pBI系のバイナリーベクターまたは中間ベクター系が好適に用いられ得る。例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3などが挙げられる。これらのベクターは、植物に導入され得る領域(T-DNA領域)の遺伝子と、マーカー遺伝子として植物プロモーターの支配下で発現されるNPTII遺伝子(カナマイシン耐性を付与する)とを含む。pUC系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入し得る。例えば、pUC18、pUC19、pUC9などが挙げられる。

本発明の植物発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。好適には、上記ベクターのプロモーター下流に本発明の転写因子をコードする遺伝子が組み込まれる。

植物細胞への植物発現ベクターの導入には、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法および直接細胞に導入する方法が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagelら(1990)の方法が用いられ得る。この方法では、まず、例えば植物発現ベクターでエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムを形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムを植物細胞に導入する。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法その他、リン酸カルシウム法およびポリエチレングリコール(PEG)法などがある。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

植物発現ベクターを導入することにより形質転換した細胞は、まずカナマイシン耐性などの薬剤耐性、または他の適切な表現型を指標として選択される。次い

で、常法により、植物組織、植物器官および／または植物体に再分化され得る。さらに、再生された植物体から種子が取得され得る。このようにして、本発明の転写因子をコードする遺伝子を細胞内に有する形質転換植物が得られる。

5 得られた植物において、本発明の転写因子が産生されることにより、エチレン誘導性遺伝子群および／または傷誘導性遺伝子群の発現が促進され得、その結果、環境ストレスに対する抵抗性が付与され得る。

本明細書において、「環境ストレス」とは、自然界で植物が受け得る、その生育を妨げる任意のストレスをいう。環境ストレスの例としては、病原体感染、傷  
10 ストレス、強光、低温、凍結、乾燥、高温、高塩濃度、UV照射、オゾン、虫害および除草剤などが挙げられる。「病原体感染」とは、植物の病原因子による感染をいい、ウイルス、ウイロイド、糸状菌および細菌による感染を含む。「傷ストレス」とは、植物が外的に受ける機械的損傷をいう。

環境ストレスに対しての「抵抗性の付与」とは、植物に新たな抵抗性を付与すること、または既に抵抗性を有する植物のその抵抗性を増強することをいう。  
15 環境ストレスに対して植物に抵抗性を付与する遺伝子を「ストレス抵抗性遺伝子」という。その例としては、エチレン誘導性遺伝子、酸性PR遺伝子を含むサリチル酸誘導性遺伝子、および傷誘導性遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

「傷誘導性遺伝子」とは、植物が傷ストレス下に曝露された際に、その発現が誘導される遺伝子である。傷誘導性遺伝子の例としては、プロテイナーゼインヒ  
20 ビター（PI）群、タンパク質分解酵素群（例えば、ポリフェノールオキシダーゼおよびリポキシゲナーゼなど）、傷誘導性MAPキナーゼ、および塩基性PRタンパク質（例えば、PR-1～PR-5）などをコードする種々の遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

環境ストレスに対する抵抗性の有無は、植物がある環境ストレス下におかれた  
25 場合の、形質転換植物とコントロール植物との間に観察され得る差異を評価することにより、確認できる。

例えば、病原体感染に対する形質転換植物の病害抵抗性は、病原体感染における、形質転換植物とコントロール植物との間の形態学的変化の差異として評価される。例えば、病原体感染後の形質転換植物において観察され得る病斑の程度が、コントロール植物に比べて有意に抑制されている場合は、その形質転換植物には抵抗性が付与されている。

植物は、傷をつけられると、傷害抵抗性応答機構（例えば、虫害耐性および病害抵抗性）が活性化されることが知られている（Ryanら、1992）。従って、例えば、傷ストレスに対する形質転換植物の抵抗性は、植物が傷害を受けた後の形質転換植物における病害抵抗性を、上述のように調べることにより確認される。形質転換植物の病斑の程度が、コントロール植物に比べて有意に抑制されている場合は、その形質転換植物には傷ストレスに対する抵抗性が付与されている。本発明において、「傷ストレス抵抗性」とは、植物が傷害を受けた後、虫害耐性および病原体抵抗性の少なくとも1つに対して示される抵抗性をいう。

以下の実施例は、本発明の例示のみを目的として記載されるものであり、本発明をいかなる点からも制限することを意図しない。

## 実施例

実施例において使用した制限酵素、プラスミドなどの材料は、いずれも商業的な供給源から入手可能である。

（実施例1：TEILはEIN3のホモログである）

本発明者らのグループは、以前にタバコPR1aプロモーターにおける隣接部位（psl部位）は、*Nicotiana tabacum* cv Samsun NNの健全な葉に存在する核因子により結合されるが、酸性PR1タンパク質を恒常的に産生する、*Nicotiana glutinosa*と*Nicotiana debneyi*との雑種ハイブリッドにおいては、psl部位はこのような核因子により結合されないことを見出した（Hagiwaraら、1993）。

本発明者らは、酵母ワンハイブリッド系を用いて、psl配列に配列特異的な結



合を示す *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN 由来の cDNA を、pGAD424 ベクター中で単離した (pGAD-TEIL と命名)。簡潔には、psI 部位を上流に有する HIS3 レポーター遺伝子 ( (psI)<sub>4</sub>-CYC-HIS3) を活性化したが、psI を有さないレポーター遺伝子 (CYC1-HIS3) を活性化しない、(pGAD424 ベクター中の) cDNA クローン (pGAD-TEIL) を単離した。

配列解析により、pGAD424 における cDNA の ORF は、GAL4 活性化ドメインとインフレーションであり、そして 534 アミノ酸残基をコードすることが示された。PCR ベースのクローニング戦略により単離された N 末端伸張領域は、81 アミノ酸残基をコードした。従って、完全長の cDNA は 615 アミノ酸残基をコードすることが示された (図 2)。推定のアミノ酸配列において、bZIP (basic-leucine-zipper)、ジンクフィンガーおよび bHLH (basic-helix-loop-helix) のような、DNA 結合タンパク質に特徴的なモチーフは存在しなかった。しかし、このアミノ酸配列を SWISS-PROT データベースについての照会配列として使用したところ、EIN3 (ethylene insensitive 3) のアミノ酸配列と有意な相同性を有することが見出された。本発明者らは、このアミノ酸配列からなるタンパク質を、TEIL (tobacco EIN-like) と命名した。

EIN3 は、シロイヌナズナ遺伝子によりコードされ、そしてエチレンシグナル伝達経路において ETR1 (ethylene resistant 1)、CTR1 (constitutive triple response 1)、および EIN2 (ethylene insensitive 2) の下流で作用する (Chao ら、1997)。EIN3 の変異により、エチレン不感受性変異体 (ein3) が生じる。TEIL のアミノ酸配列は、EIN3 のアミノ酸配列と、全体で 60% の配列同一性を共有する。両者のアミノ酸配列の 80~300 位にわたる N 末端側半分においては、92% の配列同一性が認められる (図 3)。TEIL のアミノ酸配列はまた、EIN3 に関連するタンパク質として単離された、シロイヌナズナ由来の EIL1~3 のアミノ酸配列に対しても高い相同性 (58%~35% の配列同一性) を示す。TEIL に対する関連性は、EIL1 が最も密接であり、EIL2 および EIL3 については、より低かった。全体の類似性の程

度、およびEIL2以外のこれらのタンパク質に特徴的な塩基性ドメインIV（TEILにおけるアミノ酸267～276位に相当するドメイン）の存在を考慮すると、TEILは、シロイヌナズナEIN3ファミリー中で、EIN3およびEIL1に最も近いようである。

（実施例2：DNA結合ドメインは、N末端領域に局在する）

5       TEILのDNA結合活性を有するドメインを決定するために、TEILのいくつかの欠失変異を作製して、それらのDNA結合能力について試験した。完全長のTEIL、またはN末端欠失変異体もしくはC末端欠失変異体とTrx（チオレドキシン）との組換え融合体を作製した。次いでアフィニティーカラムを用いて、これらの融合体を精製した（図4A）。精製物を、obs1を用いて電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）に供した（図4B）。obs1は、以下に示すようにTEIL結合について高い親和性を有するプローブDNAである（obs1の配列については、図6Aを参照）。なお、EMSAにおいて用いたプローブは、全て相補鎖と結合させた二本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの組換えタンパク質、特に、N末端領域を含む組換えタンパク質は、*E. coli*において十分多量に発現させることが困難であったので、部分的に精製した状態で使用した。サンプル中の目的のタンパク質を、Sタンパク質を用いるウエスタンブロット分析により定量した（データ示さず）。

15       Trx- $\Delta$ N1は、TEILアミノ酸配列の残基1～81にわたるN末端領域が欠失した変異体である。Trx- $\Delta$ N1は、プローブDNAに結合する能力を保持したが、親和性は、完全長のTEIL（WT）の場合に比べて約30%減少した（図4B；レーン1と比較したレーン2）。残基93、132、および160までのN末端領域のさらなる欠失（それぞれ、 $\Delta$ N2、 $\Delta$ N3および $\Delta$ N4に対応する）は、DNA結合能力における完全な欠損をもたらした（図4B；レーン3～5）。また、残基413～615および残基303～615にわたるC末端領域をそれぞれ欠失した、 $\Delta$ C1および $\Delta$ C2は、完全長のTEIL（WT）に比べて、10～15%のDNA結合活性を有した（図4B；レーン1と比較したレーン6および7）。アミノ酸配列の、残基226～615にわたるさらなる欠失（ $\Delta$ C3に対応する）は、結合活性における完全な欠損をもたらした（図4B；レーン8

）。C末端欠失変異体をまた、(ps1)<sub>4</sub>-CYC1-HIS3レポーターを用いる酵母ワンハイブリッドアッセイを使用したインビボ実験により試験した。pGBT9 (Clontech) にクローン化したΔC3構築物は、レポーター遺伝子を活性化しなかった。一方、同様にクローン化したΔC2構築物は、完全長のTEIL (WT) に比べて活性化の能力は弱かったものの、レポーター遺伝子を活性化した（データ示さず）。これらの結果は、TEILのDNA結合活性には少なくともアミノ酸配列の残基82～302にわたる領域が必要であること、およびより高いDNA結合活性のためには、N末端およびC末端に向かってさらに伸張する領域（例えば、アミノ酸配列の残基82～412にわたる領域）が必要であることを示す。

10 (実施例3：TEILの至適な結合配列は8 bpを含む)

TEILは、タバコPR1aプロモーターにおけるps1に結合するが、TEILとの結合についてps1よりも好ましい配列が存在すると考えられる。TEILについての至適な結合配列を決定するために、本発明者らは、精製組換えTrx (チオレドキシン)-TEIL融合タンパク質を用いるランダム結合部位選択分析を行った。PCRプライマーのためのアニーリング部位が両端に結合したランダムな18マーからなる、二本鎖オリゴヌクレオチドとともに、融合タンパク質をインキュベートした。DNAタンパク質複合体をポリアクリルアミド電気泳動により分離した後、Trx-TEILが結合したオリゴヌクレオチドのバンドをPCR増幅した。4サイクルの選択後、選択されたオリゴヌクレオチドをプラスミド (PGEM-3Zf(+), Promega Corporation) 中にクローン化した。個々のクローンから、全部で87個のオリゴヌクレオチドを配列決定した (図5A)。これらの配列の比較から、TEILについてのコンセンサス配列は、A(T/c)G(A/T)A(C/T)CT (図5B) であることが示された。このコンセンサス配列は、ps1 (ATGAATAA) の配列と6 bp一致する。

本発明者らはさらに、これらの87個の配列からランダムに選択した39個のフラグメントの相対的な親和性を、この39個のフラグメントをTEILに対するプローブDNAとして使用するEMSAにより決定した（データ示さず）。これらの配列のTEIL

に対する親和性は、かなり広い範囲にわたり、親和性の最大値は最小値の20倍であった。TEILに対して相対的に高い親和性を示すほとんどの配列は、コンセンサス配列と相関した。コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTにおいて、下線を付したヌクレオチドは、選択された配列において特に高い保存性を有していた。

5       コンセンサス配列の重要性を確認するために、本発明者らは、さらに、下線を付したヌクレオチドを変異したオリゴヌクレオチドプローブ（図6A）を用いて、TEILとの結合について、EMSA分析を行った。至適な結合配列を有するプローブとして、コンセンサス配列ATGTACCTを含む配列37（図5A）を使用した（obs1と命名する、図6Aを参照）。

10       まず、TEIL結合に対する、obs1におけるコンセンサス配列に隣接する配列の影響を試験するために、隣接配列の11ヌクレオチドを、タバコPR-1aプロモーター中のps1部位の隣接配列に交換してobs2を作製した（図6A）。obs2配列は、TEIL結合についてobs1とほとんど同じ活性を有した（図6B；レーン2）。この結果は、結合に対するobs1における隣接配列の影響はほとんどないことを示す。

15       コンセンサス配列の1番目のオリゴヌクレオチドをAからCへ変換した変異体（obsm1）は、obs2に比べて約半分の結合親和性を有した（図6B；レーン3）。3番目または5番目のヌクレオチドの変異体（obsm2またはobsm3）は、TEIL結合の相当な減少を生じた（図6B；レーン4または5に対応）。このことは、3番目および5番目のヌクレオチドは結合に絶対的に必要であり得ることを示す。一方、8番目のヌクレオチドをTからGへ変換した変異体（obsm4）は、結合親和性に影響しなかった。9番目のオリゴヌクレオチドのGからTへの変異（obsm5）もまた、結合選択において影響しなかった（図6B；レーン7）。これらの結果は、コンセンサス配列における1番目のAおよび8番目のTの、TEIL結合への寄与は、それぞれ、中程度およびわずかであることを示唆する。なお、obs1配列は、  
20       ps1よりもTEILについて非常に高い親和性を有した（図6B、レーン8）。

（実施例4：エチレン処理した葉からの核抽出物は、TEIL結合部位（tebs）に

に対する増強された結合活性を有する)

組換えTEILタンパク質は、TEIL結合部位 (tebs) の高親和性配列であるobs1  
に対して強力な結合を示した。タバコ核抽出物におけるtebs結合活性を有するタン  
パク質の存在を確認するために、本発明者らは、4コピーのobs1を含む標識DN  
5 Aプローブを用いて、電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) を行った。未処理  
のタバコ葉からの核抽出物は、プローブに対する結合活性をほとんど含まなかつ  
た (図7 ; レーン1)。これに対して、エチレン処理した葉については、十分な  
活性が示されて明らかにバンドがシフトした (図7 ; レーン2)。この標識DNA-  
タンパク質複合体形成は、過剰なobs1拮抗オリゴヌクレオチドとして添加するこ  
10 とにより、阻害された (図7 ; レーン3 および4)。一方、非常に弱いTEIL結合  
活性しか有さなかったobsm2またはobsm3オリゴヌクレオチドの過剰量を拮抗オリ  
ゴヌクレオチドとして使用した場合は、DNAプローブへの結合に対してほとんど  
影響はなかった (図7 ; レーン5 ~ 8)。このことは、エチレン処理したタバコ  
葉からの核抽出物に、tebsに対して配列特異的なDNA結合活性を有するタンパク  
15 質が存在したことを示す。エチレン処理により刺激されるこのtebsのDNA結合活  
性は、配列優先性が類似するので、TEILまたはTEIL関連タンパク質に由来するよ  
うである。

(実施例5 : TEIL遺伝子転写産物は組織特異的蓄積および傷誘導性蓄積を示す  
)

20 TEIL遺伝子転写産物について、その蓄積の組織特異性およびストレス応答性を  
試験するために、ノザンプロット分析を行った。転写産物を検出するためのDNA  
プローブとして、TEILのC末端領域に相当するcDNAを用いた。エチジウムブロミ  
ド (EtBr) でゲルを染色することにより、RNAが等量ずつゲルにロードされてい  
ることを確認した。転写産物は、タバコの茎、根、および一部老化した下位葉に  
25 において豊富に見出され、そして健全な成熟葉および未成熟の葉、花芽、ならびに  
懸濁培養したBY2細胞においてはほとんど見出されなかった (図8 A)。成熟タバコ

パコ葉を小片に切断してインキュベートした場合、0時間に存在する低レベルの転写産物は、傷処理の30分後は検出不可能になり、そして2時間後、再び増加して24時間まで増加を継続した（図8B）。切り出した葉をサリチル酸またはジャスモン酸を含む水とともにインキュベートした場合、転写産物の誘導のタイミングおよびレベルは、水単独の場合と同じであった（データは示さず）。さらに、無傷の芽生えにエチレンまたはジャスモン酸を適用した場合、実質的な変化は観察されなかった（データは示さず）。これらの観察結果は、TEIL転写産物が、組織特異的様式で茎および根に豊富に蓄積し、そしてサリチル酸、ジャスモン酸、およびエチレンとは独立して、傷を生じた際に誘導性であることを示す。

10       （実施例6：タバコプロトプラストにおいてobs1レポーター遺伝子は内因的に活性化され、さらにTEILによりトランス活性化される）

次いで、本発明者らはタバコ葉肉プロトプラストにおいて、転写調節エレメントとしてのiebs配列の活性をobs1レポーター遺伝子を使用して試験した。obs1レポーター構築物（obs1-GUS）は、obs1の4つの反復配列を上流に有するCaMV 35S (-54)プロモーター（CaMV minimal promoter）と細菌性β-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子との融合物である。コントロールレポーター構築物（obsm2-Gus）においては、obs1-GUSにおけるobs-1の4つの反復配列を、obsm2の4つの反復配列で置換した。これらの構築物を、それぞれ、タバコ葉肉プロトプラストにトランスフェクトした。obs1-GUSでは、obsm2-GUSに比べて、7～10倍高いGUS活性が観察された（データは示さず）。この観察結果は、TEILまたは関連タンパク質の活性な形態がタバコ葉肉プロトプラストに内因的に存在し、そしてobs1配列への配列特異的な結合を介してレポーター遺伝子を活性化したことを示唆する。

さらに、obs1-GUSと、エフェクタープラスミド（35S-TEIL）またはコントロールエフェクタープラスミド（35S-NPTII）とを、タバコ葉肉プロトプラストに同時トランスフェクトした。35S-TEILおよび35S-NPTIIは、それぞれ、CaMV 35S RNAプロモーターに作動可能に連結されたTEIL cDNAおよびネオマイシンホストトラ

ンスフェラーゼ遺伝子を含む構築物である。obs1-GUSと35S-TEILとの組み合わせにおいて、35S-NPTIIとの組み合わせに比べて、さらに約2～3倍、レポーター遺伝子の発現によるGUS活性の増強が観察された（図9の右半分）。対照的に、obs m2-GUSと35S-TEILとの同時トランスフェクションは、obs m-2GUS単独でのトランスフェクションに比べてレポーター遺伝子のわずかなレベルの活性化を生じただけであった（図9の左半分）。これらの結果により、TEILが転写活性化機能を有し、そしてtebsに対する配列特異的な結合を介して標的遺伝子に作用することが示される。

（実施例7：転写活性化ドメインは、C末端領域に局在する）

タバコプロトプラストにおいて、TEILの過剰発現が、レポーター遺伝子の転写を活性化したので、TEILタンパク質はそれ自身に転写活性化ドメインを含む可能性がある。この転写活性化ドメインを同定するために、本発明者らは酵母ワンハイブリッド系を利用した。酵母系は、レポーター遺伝子のより低い基底発現が可能であり、そして植物系に比べて再現性が高いという点で有利だからである。この系において、TEILとの融合のためのGAL4 DNA結合ドメイン（GAL4bd）と、レポーター遺伝子としてGAL1-LacZまたはGAL1-HIS3とを利用する（Clontech）。従って、TEILとGAL4bdとの融合物は、GAL4に由来する（GAL1への）DNA結合活性とTEILに由来する転写活性とを有することにより、これらのレポーター遺伝子を活性化すると考えられる。表2に示すように、pGBT-TEIL（GAL4dbとTEILタンパク質との融合物を産生するプラスミド）は、酵母においてレポーター遺伝子（lacZまたはHIS3）を活性化した。活性化のレベルは、コントロールとして使用したpCL1（完全長のGAL4タンパク質を産生するプラスミド）の場合ほど高くはなかった。なお、表2において、pGBT9は、GAL4 DNA結合ドメインのみを有するコントロール構築物を示す。

表 2

## TEIL タンパク質の活性化ドメインの局在

プラスミド	レポーター (表現型 <sup>a</sup> )	<i>lacZ</i> レポーター ( $\beta$ -gal; 単位 <sup>b</sup> )
pGBT9	HIS <sup>-</sup>	0.35
pGBT-TEIL	HIS <sup>+</sup>	13.1
pGBT-C556	HIS <sup>+</sup>	7.5
pGBT-C481	HIS <sup>-</sup>	0.21
pGBT-C412	HIS <sup>-</sup>	0.39
pCL1	HIS <sup>+</sup>	95

<sup>a</sup> His<sup>+</sup>またはHis<sup>-</sup>はヒスチジン非含有培地における形質転換酵母の表現型を表す。

<sup>b</sup> 値は3つの独立したコロニーからの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の平均値を表す。単位は1 $\mu$ mol of o-ニトロフェニル  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド/分を加水分解する量として定義される。



DNA結合領域がN末端領域に存在することを考慮して、GAL4bdとの融合パートナーとして、TEILの一連のC末端欠失変異体を作製した。pGBT-C556（アミノ酸配列の残基557～615にわたる領域を欠損するTEIL変異体を産生するプラスミド）は、野生型TEILの約半分の活性を保持した。一方、pGBT-C481およびpGBT-C412（  
5 それぞれ、残基482～523および残基413～523にわたる領域を欠損するTEIL変異体を産生する）は、完全に活性を欠損した。このことは、TEILの転写活性化領域が、アミノ酸配列の残基482～615にわたる領域（特に、残基482～556にわたる領域）に位置することを示す。しかし、残基482～615にわたる領域において、公知の転写活性化ドメイン（グルタミンリッチ配列、プロリンリッチ配列、または酸アミノ  
10 ノ酸リッチ配列）は見出されなかった。

（実施例8：TEIL高発現ベクターによる形質転換植物は、恒常的にTEIL遺伝子を発現する）

市販のpBI121（Clontech）を、出発物質として用いて、TEILを高発現するベクターを構築した。pBI121は、NOSプロモーター（Pnos）およびターミネーター（  
15 Tnos）で制御されるNPTII遺伝子、マルチクローニング部位、および35S CaMVプロモーターの制御下にあり、Tnosを有する大腸菌由来の $\beta$ -GUS遺伝子を含むプラスミドである。

pBI121をまず、XbaIおよびBamHIで切断し、大きな断片を回収した。この断片に、プラスミド(pBSK-TEIL)を制限酵素（SpeIおよびBglII）で消化して切り出したTEIL cDNAの断片を連結した後、大腸菌JM109に導入した。カナマイシン耐性  
20 株を回収して、目的とする高発現ベクター（pBI-35S-TEIL）を得た。制限酵素解析により、正しい方向にTEIL遺伝子が導入されたことを確認した。

得られた発現構築物を、Agrobacterium tumefaciens LBA4404（Oomsら、1981）に、エレクトロポレーション（Wen-JunおよびForde、1989）により導入した。  
25 Nicotiana tabacum cv. Samsun NNの形質転換を、葉片共存培養法（Horschら、1985）により行った。葉片を、細菌溶液中に浸し、次いで、これを、インキュベ

ーション培地（3%スクロースおよびB5ビタミンを有するMurashige-Skoog (MS) 基本培地）に移した。2日間、25℃、白色蛍光灯の連続的な照射下、 $120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度において、共存培養した。次いで、この葉片を、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含む培地に移して、上記細菌を除去した。3週間ごとに選択培地で継代し、  
5 カナマイシンを含有する培地中で形成されたシュートを、ホルモンを減少させた選択培地に移した。根形成後、植物を土の入ったポットに移した。14個体の独立した形質転換タバコ個体（35S-TEIL-1～14）を得た。

得られた形質転換体におけるTEIL遺伝子の発現を、以下のように確認した。得られた形質転換体のうち3個体（35S-TEIL-2、35S-TEIL-10および35S-TEIL-14系  
10 統）の葉から、常法によって、mRNAを抽出した後、TEIL cDNAをプローブとして、ノザンブロット解析を行った。コントロールとして、非形質転換植物（*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN）の無傷の葉（SNN）および傷をつけた1日後の葉（SNN-wound）を使用した。結果を、図10に示す。

無傷のコントロール植物の葉（SNN）において、TEIL遺伝子の発現は認められ  
15 なかった（レーン1）。傷をつけた1日後のコントロール植物の葉（SNN-wound）においては、低レベルのTEIL遺伝子の発現が認められた（レーン5）。一方、形質転換植物においては、恒常的にTEILが高発現していることが確認された（レーン2～4）。

（実施例9：TEIL高発現形質転換タバコは、塩基性PR遺伝子をも恒常的に発現  
20 する）

恒常的にTEILを産生する形質転換植物（35S-TEIL-2、35S-TEIL-10および35S-TEIL-14系統）における、塩基性PR遺伝子の発現を調べた。塩基性PR-5（オスモチン）遺伝子または塩基性PR-2（ $\beta$ -1,3-グルカナーゼ）遺伝子のcDNAをプローブとして用いて、実施例8に記載の方法と同様にしてノザンブロット解析を行った。  
25 結果を図10に示す。

形質転換植物の葉においては、傷をつけなくても（つまり、ストレスの不在下

であっても）、これらの塩基性PR遺伝子が恒常的に発現されていることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

5           本発明により、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子が提供される。また、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子の植物体内における発現レベルを調節することにより、環境ストレス（例えば、病害体感染および傷ストレス）に対して抵抗性が付与された植物を作出する方法が提供される。さらに、本発明により、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をスクリーニングする方法が提供される。

10

#### （参考文献）

1. Abeles (1973) Ethylene in Plant Biology (New York: Academic Press, Inc.)。
- 15 2. AbelesおよびSaltvelt (1992) Ethylene in Plant Biology, 第2版 (New York: Academic Press, Inc.)。
3. BleeckerおよびSchaller (1996) Plant Physiol. 111, 653-666。
4. Chang (1996) Trend Biochem. Sci. 21, 129-133。
5. Changら (1993) Science 262, 539-544。
- 20 6. Chaoら (1997) Cell 89, 1133-1144。
7. Clarkら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5401-5406。
8. DavisおよびHahlbrock (1987) Plant Physiol. 84, 1286-1290。
9. Deheshら (1992) EMBO J. 11, 4131-4144。
10. Despresら (1995) Plant Cell 7, 589-598。
- 25 11. Ecker (1995) Science 268, 667-675。
12. Eyalら (1993) Plant J. 4, 225-234。

- 1 3. Gilmartinら (1992) Plant Cell 4, 839-849.
- 1 4. Hagiwaraら (1993) Mol. Gen. Genet. 240, 197-205.
- 1 5. Hartら (1993) Plant Mol. Biol. 21, 121-131.
- 1 6. HerrおよびCleary (1995) Genes Dev. 9, 1679-1693.
- 5 1 7. Horschら (1985) Science, 227, 1229.
- 1 8. Kieberら (1993) Cell 72, 427-441.
- 1 9. Knoesterら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1933-1937.
- 2 0. Lawtonら (1994) Plant Cell 6, 581-588.
- 2 1. Le van Loonら (1994) Plant Molecular Biology Reporter 12, pp.245-26
- 10 4.
- 2 2. Maniatisら (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 2 3. MorganおよびDrew (1997) Plant. 100, 620-630.
- 2 4. Nagelら (1990) FEMS. Microbiol. Lett., 67, 325.
- 15 2 5. O'Donnellら (1996) Science 274, 1914-1917.
- 2 6. Ohme-TakagiおよびShinshi (1990) Plant Mol. Biol. 15, 941-946.
- 2 7. Ohme-TakagiおよびShinshi (1995) Plant Cell 7, 173-182.
- 2 8. Oomsら, Gene, 14, 33 (1981)
- 2 9. Raghothamaら (1993) Plant Mol. Biol. 23, 1117-1128.
- 20 3 0. Raventosら (1995) Plant J. 7, 147-155.
- 3 1. Romanら (1995) Genetics 139, 1393-1409.
- 3 2. Rushton (1996) EMBO J. 15, 5690-5700.
- 3 3. Ryanら (1992) Plant Mol. Biol., 19, 123-133.
- 3 4. SchallerおよびBleecker (1995) Science 270, 1809-1811.
- 25 3 5. Sessaら (1995) Plant Mol. Biol 28, 145-153.
- 3 6. Shinshiら (1995) Plant Mol. Biol. 27, 923-932.

37. van de Lochtら、(1990) EMBO J. 9, 2945-2950。
38. YangおよびHoffman (1984) Plant Physiol. 35, 155-189。
39. Wen-JunおよびForde (1989) Nucleic Acid Research, 17, 8385。
40. ZollerおよびSmith (1982) Nucl. Acid Research, 10, 6487-6500。

## 請求の範囲

1. エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子であって、コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して特異的な結合活性を有する、転写因子。

5

2. 以下の(a)または(b)である、請求項1に記載の転写因子：

(a) 配列表の配列番号2の82位のGluから302位のArgまでのアミノ酸、および配列番号2の482位のValから615位のTyrまでのアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、転写因子；または

10

(b) アミノ酸配列(a)において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子。

3. 以下の(c)または(d)である、請求項2に記載の転写因子：

15

(c) 配列表の配列番号2の1位のMetから615位のTyrまでのアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する転写因子；または

(d) アミノ酸配列(c)において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子。

20

4. 傷誘導性遺伝子の発現を制御する、請求項1に記載の転写因子。

5. 前記エチレン誘導性遺伝子群が、塩基性PR遺伝子群を含む、請求項1に記載の転写因子。

25

6. 前記塩基性PR遺伝子群が、塩基性PR-2遺伝子および塩基性PR-5遺伝子を含む、

請求項 5 に記載の転写因子。

7. 請求項 1 に記載の転写因子をコードする遺伝子。

5 8. 植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与する方法であって、  
請求項 7 に記載の遺伝子を含むポリヌクレオチドで、植物細胞を形質転換する  
工程；および、  
該形質転換した植物細胞を再分化させて、植物を得る工程、  
を包含する、方法。

10

9. 以下の (i) または (ii) の DNA からなる、エチレン誘導性遺伝子群の発現を  
制御する転写因子をコードする遺伝子：

(i) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA；または  
(ii) 塩基配列 (i) を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ  
15 し、エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードする DNA。

10. 植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与する方法であって、

請求項 9 に記載の遺伝子を含むポリヌクレオチドで、植物細胞を形質転換する  
工程；および、

20 該形質転換した植物細胞を再分化させて、植物を得る工程、  
を包含する、方法。

11. 前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA を含む、  
請求項 10 に記載の方法。

25

12. 前記環境ストレスが病原体感染を含む、請求項 10 に記載の方法。

1 3. 前記環境ストレスが傷ストレスを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

1 4. エチレン誘導性遺伝子群の発現を制御する転写因子をスクリーニングする  
5 方法であって、

コンセンサス配列A(T/c)G(A/T)A(C/T)CTに対して特異的な結合活性を有するタンパク質を同定する工程を包含する、方法。



図 1

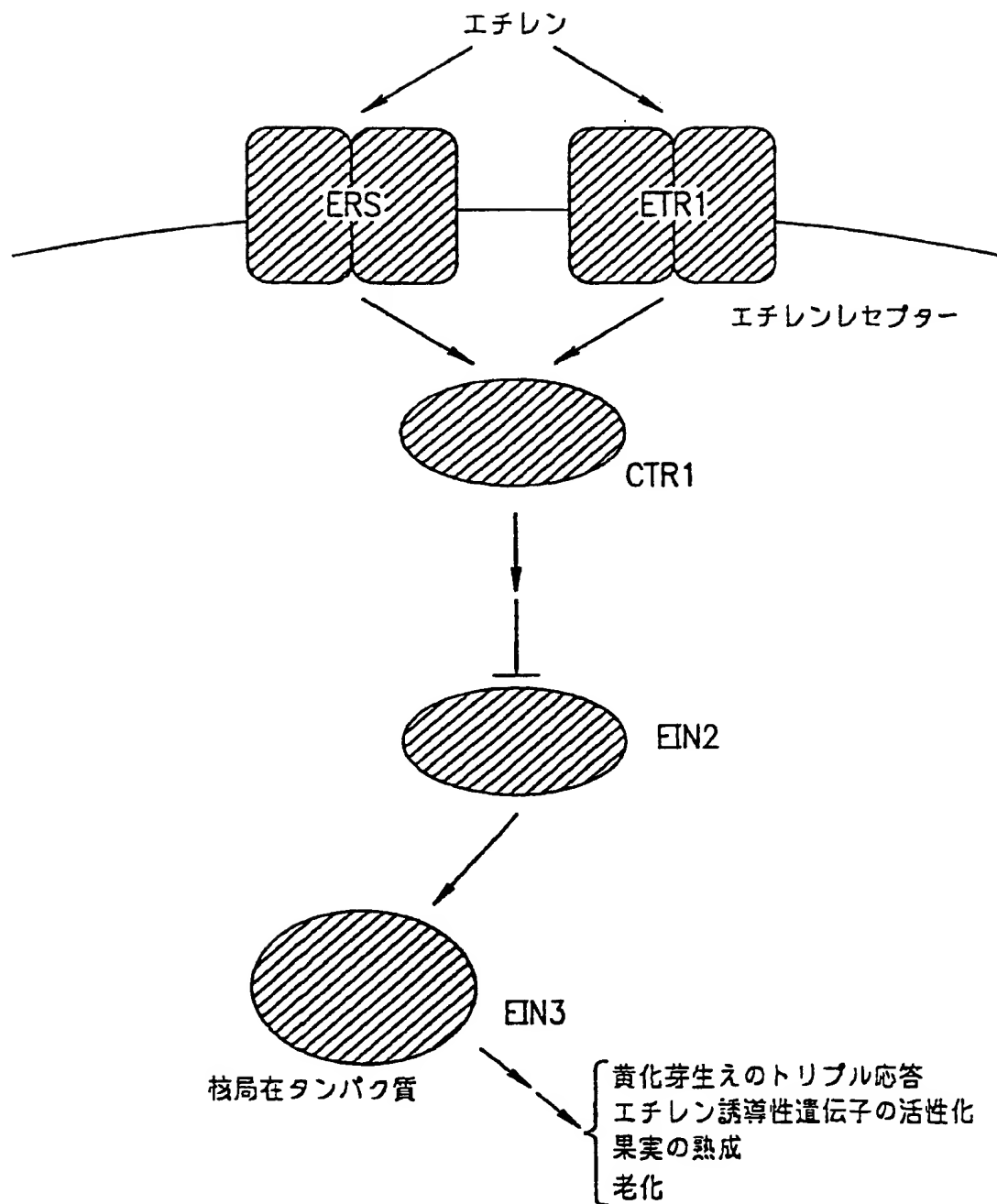


图 2

[illegible]

3

TEIL MWMIEBUCFCGDLDFEPAPLKEVETAASIDPQSEPVMODDYSDEETDVEDEARR 55  
 EIN3 -MWMIEBUCFCGDLDFEPAPLKEVETAASIDPQSEPVMODDYSDEETDVEDEARR 54  
 EIL1 MWMIEBUCFCGDLDFEPAPLKEVETAASIDPQSEPVMODDYSDEETDVEDEARR 54

TEIL MWRDKMRLKRLKEQKQKKEGVDAVKOROSQEQARRKKNSRAQDGLKTYLAKME 110  
 EIN3 MWRDKMRLKRLKEQKQKKEGVDAVKOROSQEQARRKKNSRAQDGLKTYLAKME 108  
 EIL1 MWRDKMRLKRLKEQKQKKEGVDAVKOROSQEQARRKKNSRAQDGLKTYLAKME 109

TEIL VCKAQGFVYGIIPKPKFVTGASDNLREWWDKVRFDNRNGPAAIAKYQADNIPG 165  
 EIN3 VCKAQGFVYGIIPKPKFVTGASDNLREWWDKVRFDNRNGPAAIAKYQADNIPG 163  
 EIL1 VCKAQGFVYGIIPKPKFVTGASDNLREWWDKVRFDNRNGPAAIAKYQADNIPG 164

TEIL KNECSNP-IGPTPHTLOELQDTTLGSLLSALMOHCDFPQRRFPLEKGVPPFWMET 219  
 EIN3 KNECSNP-IGPTPHTLOELQDTTLGSLLSALMOHCDFPQRRFPLEKGVPPFWMET 217  
 EIL1 KNECSNP-IGPTPHTLOELQDTTLGSLLSALMOHCDFPQRRFPLEKGVPPFWMET 219

TEIL GEDNWPOLGLSKDQGPFPYKPKPHDLKAWKVGVLTAVIDKMSPDIAKIRKLVRQ 274  
 EIN3 GEDNWPOLGLSKDQGPFPYKPKPHDLKAWKVGVLTAVIDKMSPDIAKIRKLVRQ 272  
 EIL1 GEDNWPOLGLSKDQGPFPYKPKPHDLKAWKVGVLTAVIDKMSPDIAKIRKLVRQ 274

TEIL SKCLQDRWTAKESATWLALINOEEVARELYPESCPLSSAG--GSGFTDMYSS 327  
 EIN3 SKCLQDRWTAKESATWLALINOEEVARELYPESCPLSSAG--GSGFTDMYSS 325  
 EIL1 SKCLQDRWTAKESATWLALINOEEVARELYPESCPLSSAG--GSGFTDMYSS 329

TEIL EYDUDGVVDEPN-EDVQEQKPNELGLIMYVDFRERLPMQOCSLETKDEIMIA-N 380  
 EIN3 EYDUDGVVDEPN-EDVQEQKPNELGLIMYVDFRERLPMQOCSLETKDEIMIA-N 373  
 EIL1 EYDUDGVVDEPN-EDVQEQKPNELGLIMYVDFRERLPMQOCSLETKDEIMIA-N 380

TEIL LIDFTRRRKPADELTFIAMDORI--YTCEGLQCPHSELRNGEODRSSRDNHOLACPF 433  
 EIN3 LIDFTRRRKPADELTFIAMDORI--YTCEGLQCPHSELRNGEODRSSRDNHOLACPF 426  
 EIL1 LIDFTRRRKPADELTFIAMDORI--YTCEGLQCPHSELRNGEODRSSRDNHOLACPF 435

TEIL RNSP-OEGV--SNFHVDEVKPUVEPQQYVQPKPASLEINQAPPSEDLSCGIGVPED 485  
 EIN3 RNSP-OEGV--SNFHVDEVKPUVEPQQYVQPKPASLEINQAPPSEDLSCGIGVPED 473  
 EIL1 RNSP-OEGV--SNFHVDEVKPUVEPQQYVQPKPASLEINQAPPSEDLSCGIGVPED 474

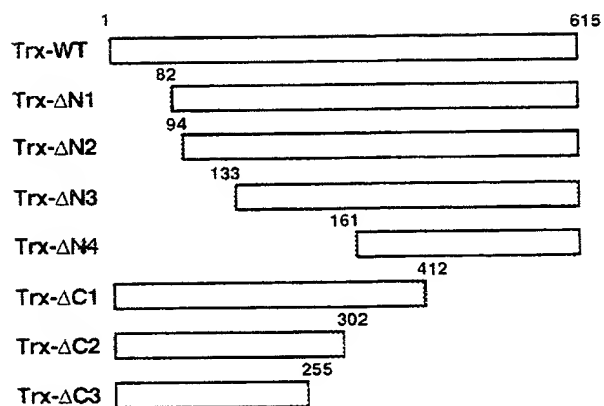
TEIL GORMINELWSPYDNLGKNSSWAAN-VVMSKEORQQPSIQONNYLEN--QGII 537  
 EIN3 GORMINELWSPYDNLGKNSSWAAN-VVMSKEORQQPSIQONNYLEN--QGII 528  
 EIL1 GORMINELWSPYDNLGKNSSWAAN-VVMSKEORQQPSIQONNYLEN--QGII 526

TEIL LDG-NI--FGDYNISANESMEFQGD-----REF--QSKVLTSPF--NAGSND 577  
 EIN3 LDG-NI--FGDYNISANESMEFQGD-----REF--QSKVLTSPF--NAGSND 583  
 EIL1 LDG-NI--FGDYNISANESMEFQGD-----REF--QSKVLTSPF--NAGSND 546

TEIL NSEFMPGS-PENLCSIDYTE--ALSGI--TODNUP-KQ-DVFWY 615  
 EIN3 NSEFMPGS-PENLCSIDYTE--ALSGI--TODNUP-KQ-DVFWY 628  
 EIL1 NSEFMPGS-PENLCSIDYTE--ALSGI--TODNUP-KQ-DVFWY 584

4

**A**



**B**

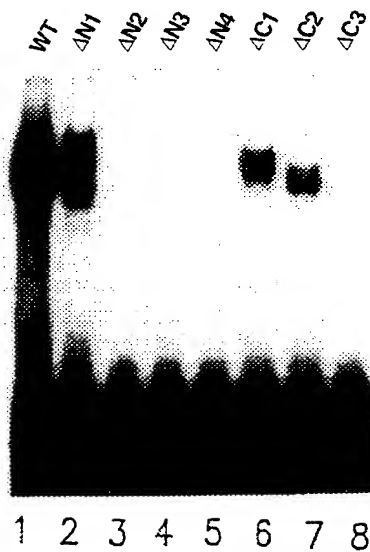


図 5

A

## 相対的親和性

1	CAACACGCAGAATCTGGACGTT	5	51	ACGTATCTGGACATAATCACT
2	GCCTTGTTTCATGGACCTG	9	52	ACGTATTTAGACAGATTTTAT
3	GTACGTACGTCGAATCTA	10	53	GTTAAATTCGATGTACCTA
4	AACTGTACGTTGTATTTGA	12	54	CGAAACATTGTATGTAGTCG
5	CTGCAGACGATGTATCTG	12	55	GTTGAGTGAGTCTGGTCA
6	ACGTACTTGGCCCTTTTATG	15	56	TTCTATTCACTGCATCTG
7	GTTTCATGAATCTATGATA	17	57	AGATACAATGCATCGGAC
8	TTGGGGGGGTTGTATTTGGCTT	18	58	GATGCGCTGTATGTAGACC
9	CGCGCAAGGGGGGATGTACGTT	20	59	GCTTGGTGCACTGTATCCG
10	TGAATTCAATGTACCCTA	21	60	TCGCATGCACCTAGCCG
11	AAACATGAATCTAGCCGC	22	61	CCAGGTACAATGAACATG
12	TGCATGTATCTTCGATGT	23	62	CCGGCATGTACCTAGTCA
13	TAAGTACAATGAACCAGC	24	63	ACGTATCTAGACGTCATATTG
14	TCCAGATTTCGTGTATGTG	25	64	AGATACATGAACCTCCCC
15	GTCTGGTGCATGTATCTCGCTT	27	65	TTTATGTGCATGTATCTA
16	ACCGACGTATCTGGACAA	28	66	ATGGGGGGGGGTGTACCTA
17	CCAACCACATTCAATGAACGTT	30	67	TACTTGGTTCGCATTTAC
18	CAAGTACAATGAATCTCC	32	68	ACGTACCTGGTTCATATTTATG
19	CAGACCCAAATCAATGCACGTT	32	69	ACGTATCTTCCCCGTTTTCCG
20	TGACCGCAATCAATGTACGCG	34	70	ACGAATCTGGACTTAGTTTTT
21	CCAACCACATTCAATGAACGTT	36	71	CCGGGTTTCGTTGTATGTG
22	CTCAGACAAGAAAGAACGCG	37	72	GCCAGTTTCATTGTATTTG
23	ACGCACCTGGACTGTTTCCTT	37	73	ATGGTACAATGAACCTGC
24	AGGACCTAATTGAATGAACGTT	38	74	CCATCATTTCATGCATCTG
25	TTTGGGTTTCATGAACCTG	41	75	CCCGTGTGCATGCATATT
26	TGCTTTGTTTCATGCACCTG	46	76	TTCATGCATCTGTACTCT
27	TTCAATGTATTTGGTCCC	49	77	TACAAATGTATCGGGACA
28	CATTCAAAGAACCTAAC	49	78	TCTTCGTTCAATGAATACG
29	ATGAATCTAGACACTCA	51	79	ACGGGTGCGGTGTACCTG
30	TTTCATGAACCTGCCCACT	56	80	ATTATACGATGTACCTAC
31	TAATACAACGAACCTGGA	57	81	CGTTCGTTGTATCTGGTC
32	ACGTATCTGGTCTGGTTTCCG	64	82	ACGCACCTGGTCTCCTTTTCG
33	TGAAAACCCGTCATGTACGTT	75	83	CAGTGCGATGAACCTAGA
34	ACGTACCTGGCCGTTTTC	85	84	ATACACCGAACCTAGACA
35	ACGTATCTGGTCATTTTGTG	84	85	ACCAGTTTCAGTGTACCTGGCTT
36	ACGTACCTGGTCCACTTTCCG	94	86	ACATGCATGCACCAATGA
37	ATGTACCTGGTTCGTATTTGG	97	87	TAAAAATGAATGTAGACC
38	ACGTACCTGGTTCGTATTTGG	99		
39	AAAGGATGTATGTAGACG	100		
40	CGACAAATGGACAGGTA			
41	GCTCAATGAATCTGGCCA			
42	GGCTAATACATGAACCTG			
43	GCAATGAACCTAGGCACA			
44	ACGAACCTGGACAATTTT			
45	TAGAGACAATGTACCTAT			
46	ACAATGTGTACCTGGACA			
47	TGCGTTCAATGCATCTAG			
48	CAGATGCCATGAACCGTT			
49	CAGGGGGGACGTACTCAA			
50	CAAGTAGAACGAAACGAA			

B

A	68	1	0	29	86	1	5	3	21
T	7	66	0	43	0	37	8	74	4
G	6	0	86	3	1	2	14	3	44
C	6	20	1	12	0	47	60	7	3

コンセンサス配列

A	T	G	A	A	C	C	T	G
	c		T		T			a

[X] 6

**A**

**obs1** aacgATGTACCTGGtcgtatt  
**obs2** gtacATGTACCTGGaccgtga  
**obsm1** gtacCTGTACCTGGaccgtga  
**obsm2** gtacATTTACCTGGaccgtga  
**obsm3** gtacATGTCCCTGGaccgtga  
**obsm4** gtacATGTACCGGGaccgtga  
**obsm5** gtacATGTACCTTGaccgtga

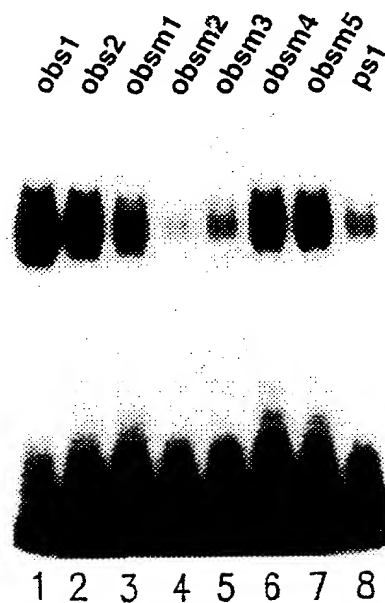
**B**

図 7

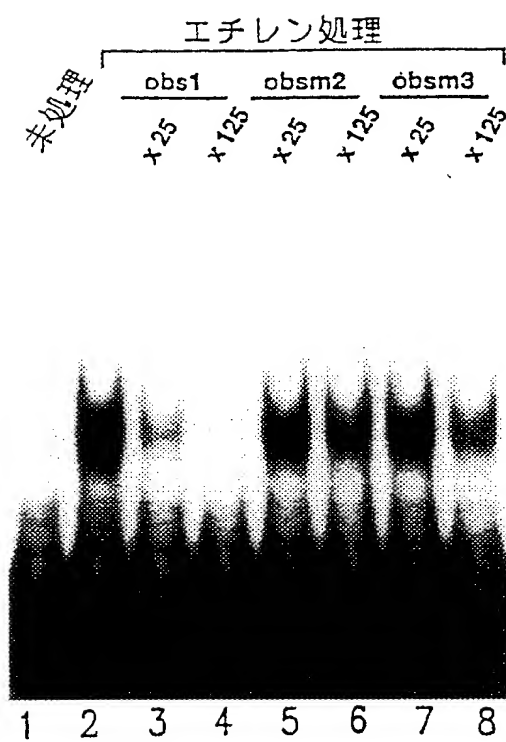


図 8

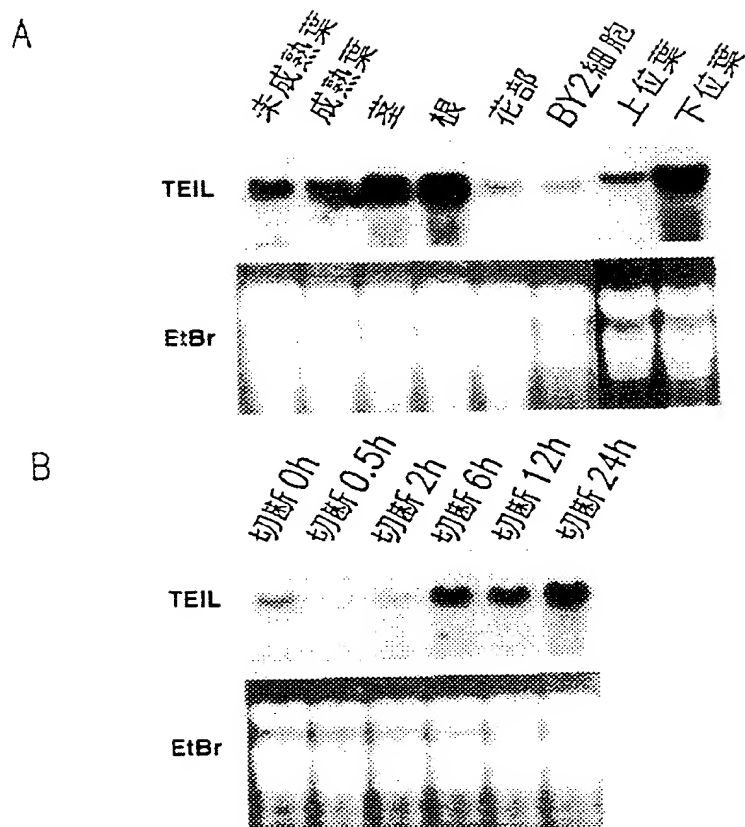




図 9

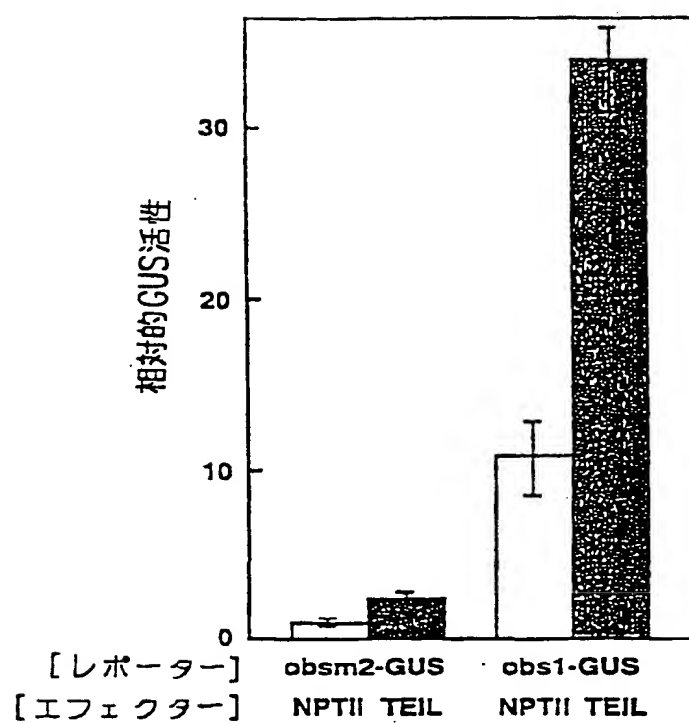
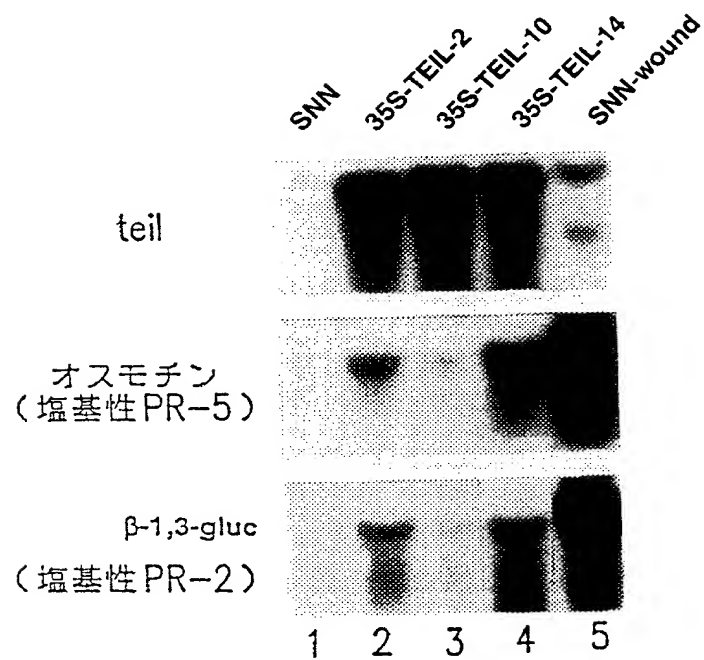


図 10

TEIL を過剰発現するトランスジェニックタバコ植物  
における塩基性 PR 遺伝子の活性化



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Resources, Ministry of  
Agriculture, Forestry and Fisheries  
Japan Science and Technology Corporation

5 <120> Transcriptional factor controlling expression of a  
group of ethylene inducible genes

<130> J1-98412316

<140> JP

<141> 1998-08-11

10 <160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2479

<212> DNA

15 <213> Nicotiana tabacum cv Samsun NN

<220>

<221> CDS

<222> (244).. (2091)

<400> 1

20 tttttctccc ttctctttct gtctctctct ctctctctct ctctctcttt tcccttggt 60  
agtcctgaagg gtcaattatt tctcatagag aagaagtgtt gaacgacttt ttgaacacaaa 120  
aaaagaaaag gaaaaaaaaac tcttttgagg aggggaagtca tcaatttgag gattagctgt 180  
ttaatcccat ttgggtttctt gaaagggtgt tactttttta accgttaatt cgggcctgcc 240  
aag atg atg atg ttt gaa gaa atg ggg ttc tgt ggc gat ctt gat ttc 288

25 Met Met Met Phe Glu Glu Met Gly Phe Cys Gly Asp Leu Asp Phe

1

5

10

15

ttc cct gct ccg cta aag gaa gtg gaa aca gct gct tcg cag att gag 336  
 Phe Pro Ala Pro Leu Lys Glu Val Glu Thr Ala Ala Ser Gln Ile Glu  
 20 25 30  
 cag gag tcg gag ccg gtg atg gat gat gat tat agc gat gag gag att 384  
 5 Gln Glu Ser Glu Pro Val Met Asp Asp Asp Tyr Ser Asp Glu Glu Ile  
 35 40 45  
 gat gtg gat gag ctg gag agg agg atg tgg agg gac aag atg aag ctg 432  
 Asp Val Asp Glu Leu Glu Arg Arg Met Trp Arg Asp Lys Met Lys Leu  
 50 55 60  
 10 aaa agg ttg aaa gaa atg act aag ggg ggt aag gaa ggt gtt gac gct 480  
 Lys Arg Leu Lys Glu Met Thr Lys Gly Gly Lys Glu Gly Val Asp Ala  
 65 70 75  
 gtc aaa caa cgc cag tct cag gag caa gcg agg agg aag aag atg tcg 528  
 Val Lys Gln Arg Gln Ser Gln Glu Gln Ala Arg Arg Lys Lys Met Ser  
 15 80 85 90 95  
 agg gca caa gac ggg atc ttg aaa tac atg ttg aag atg atg gaa gtt 576  
 Arg Ala Gln Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Met Leu Lys Met Met Glu Val  
 100 105 110  
 tgt aaa gct cag ggt ttt gtt tat gga att atc ccg gag aaa ggg aaa 624  
 20 Cys Lys Ala Gln Gly Phe Val Tyr Gly Ile Ile Pro Glu Lys Gly Lys  
 115 120 125  
 ccg gtt acc ggg gca tca gat aat ctc agg gag tgg tgg aag gat aaa 672  
 Pro Val Thr Gly Ala Ser Asp Asn Leu Arg Glu Trp Trp Lys Asp Lys  
 130 135 140  
 25 gtg agg ttc gat cga aat gga cct gca gcc ata gca aag tac caa gct 720  
 Val Arg Phe Asp Arg Asn Gly Pro Ala Ala Ile Ala Lys Tyr Gln Ala

	145	150	155	
	gat aat gcg att ccg ggc aag aat gag gga tct aat ccg att ggt cct			768
	Asp Asn Ala Ile Pro Gly Lys Asn Glu Gly Ser Asn Pro Ile Gly Pro			
	160	165	170	175
5	acc cct cac act ttg cag gag ctt caa gat acc act ctt ggc tct tta			816
	Thr Pro His Thr Leu Gln Glu Leu Gln Asp Thr Thr Leu Gly Ser Leu			
	180	185	190	
	tta tca gct ttg atg caa cat tgt gat cct cct cag agg cga ttt ccg			864
	Leu Ser Ala Leu Met Gln His Cys Asp Pro Pro Gln Arg Arg Phe Pro			
10	195	200	205	
	ttg gaa aaa ggt gtt cca cct ccg tgg tgg ccc act gga cag gag gac			912
	Leu Glu Lys Gly Val Pro Pro Pro Trp Trp Pro Thr Gly Gln Glu Asp			
	210	215	220	
	tgg tgg cct caa cta ggc ctg tgg aaa gat caa ggt cct ccg cct tat			960
15	Trp Trp Pro Gln Leu Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gly Pro Pro Pro Tyr			
	225	230	235	
	aag aag cct cac gat ctg aag aag gcg tgg aaa gtt ggt gtt ctc acc			1008
	Lys Lys Pro His Asp Leu Lys Lys Ala Trp Lys Val Gly Val Leu Thr			
	240	245	250	255
20	gcg gtg ata aag cac atg tcc cct gat atc gct aag att cgt aag ctg			1056
	Ala Val Ile Lys His Met Ser Pro Asp Ile Ala Lys Ile Arg Lys Leu			
	260	265	270	
	gta agg caa tca aag tgt ttg cag gat aag atg acg gcc aag gaa agt			1104
	Val Arg Gln Ser Lys Cys Leu Gln Asp Lys Met Thr Ala Lys Glu Ser			
25	275	280	285	
	gca act tgg ctt gcc att atc aat cag gag gaa gtt ttg gct cga gaa			1152

Ala Thr Trp Leu Ala Ile Ile Asn Gln Glu Glu Val Leu Ala Arg Glu  
290 295 300  
ctt tat cct gat cgt tgt cca cct ttg tcc tca gct ggt ggt agt gga 1200  
Leu Tyr Pro Asp Arg Cys Pro Pro Leu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Gly  
5 305 310 315  
act ttt act atg aat tac agc agt gaa tac gac gtt gac ggt gtt gta 1248  
Thr Phe Thr Met Asn Tyr Ser Ser Glu Tyr Asp Val Asp Gly Val Val  
320 325 330 335  
gat gag cct aac ttt gat gtt caa gag caa aaa cca aac cat ctc ggc 1296  
10 Asp Glu Pro Asn Phe Asp Val Gln Glu Gln Lys Pro Asn His Leu Gly  
340 345 350  
ttg ctg atg tat gtt gat cgc ttc aag gag agg ctg cct atg caa caa 1344  
Leu Leu Met Tyr Val Asp Arg Phe Lys Glu Arg Leu Pro Met Gln Gln  
355 360 365  
15 caa tct ctt cca atc aag gat gaa att atg att gcc aac tta gat ttc 1392  
Gln Ser Leu Pro Ile Lys Asp Glu Ile Met Ile Ala Asn Leu Asp Phe  
370 375 380  
act cgg aag agg aag cca gcg gat gag ctg act ttc ttg atg gat cag 1440  
Thr Arg Lys Arg Lys Pro Ala Asp Glu Leu Thr Phe Leu Met Asp Gln  
20 385 390 395  
aag ata tat act tgt gag tgt ctt caa tgt ccg cac agc gag ctc cgc 1488  
Lys Ile Tyr Thr Cys Glu Cys Leu Gln Cys Pro His Ser Glu Leu Arg  
400 405 410 415  
aat ggt ttt cag gac aga tcc tcc aga gac aat cat caa tta act tgt 1536  
25 Asn Gly Phe Gln Asp Arg Ser Ser Arg Asp Asn His Gln Leu Thr Cys  
420 425 430

cct ttc aga aac tct ccg caa ttt gga gtt tca aat ttt cat gtt gat 1584  
 Pro Phe Arg Asn Ser Pro Gln Phe Gly Val Ser Asn Phe His Val Asp  
                   435                  440                  445  
 gaa gtc aag ccg gtt gtc ttt cct caa caa tat gtc cag cca aag cca 1632  
 5 Glu Val Lys Pro Val Val Phe Pro Gln Gln Tyr Val Gln Pro Lys Pro  
                   450                  455                  460  
 gct tct ctg ccg att aac caa gct ccg cct tcc ttt gat ctg tca gga 1680  
 Ala Ser Leu Pro Ile Asn Gln Ala Pro Pro Ser Phe Asp Leu Ser Gly  
                   465                  470                  475  
 10 atc ggg gtt cct gaa gac ggg cag agg atg atc aat gag ctt atg tgc 1728  
 Ile Gly Val Pro Glu Asp Gly Gln Arg Met Ile Asn Glu Leu Met Ser  
 480                  485                  490                  495  
 ttc tac gat aat aat ata caa gga aat aaa agc tca atg gcg gcg aac 1776  
 Phe Tyr Asp Asn Asn Ile Gln Gly Asn Lys Ser Ser Met Ala Ala Asn  
 15                  500                  505                  510  
 gtt gtg atg tca aaa gag cag cct cgt caa caa cct agt att caa cag 1824  
 Val Val Met Ser Lys Glu Gln Pro Arg Gln Gln Pro Ser Ile Gln Gln  
                   515                  520                  525  
 aac aat tac cta cac aac caa ggg att ata ttg gat gga aat atc ttt 1872  
 20 Asn Asn Tyr Leu His Asn Gln Gly Ile Ile Leu Asp Gly Asn Ile Phe  
                   530                  535                  540  
 ggg gac acc aac att tct gct aac cat tcc atg ttc cca caa ggt gat 1920  
 Gly Asp Thr Asn Ile Ser Ala Asn His Ser Met Phe Pro Gln Gly Asp  
                   545                  550                  555  
 25 cgg ttt gat cag tcc aag gtt tta act tca cca ttc aat gca ggc tct 1968  
 Arg Phe Asp Gln Ser Lys Val Leu Thr Ser Pro Phe Asn Ala Gly Ser

560                      565                      570                      575  
 aac gac aat ttc cat ttc atg ttc ggg tct cca ttc aat tta cag tcc 2016  
 Asn Asp Asn Phe His Phe Met Phe Gly Ser Pro Phe Asn Leu Gln Ser  
                     580                      585                      590  
 5    act gat tac act gaa gct ctt tct ggg att aca cag gat aac atg ccg 2064  
 Thr Asp Tyr Thr Glu Ala Leu Ser Gly Ile Thr Gln Asp Asn Met Pro  
                     595                      600                      605  
 aag caa gat gtt ccg gtt tgg tat tag caaaggatgt gtgctcaaat 2111  
 Lys Gln Asp Val Pro Val Trp Tyr  
 10                      610                      615  
 gtatatcaag taccacgact ttgigcaca ggatatacact tgtttccaag agggaagatc 2171  
 tacacattat cgagtggaatt tgaatcgcc acagttctct cggtttggig tttctgttac 2231  
 tacgtagtig tagaggttgg aggattctgc atggtgtaat gaaaaaggig taagagacgt 2291  
 cctcggaat tgcctatgct ggtagaaaag aacttataga tgtttttaa taaggtagtc 2351  
 15    gtcgtttgt ttttacataa ttctgtatag gttagcttta tttagatttt caatctgttt 2411  
 aagtttctta aataactgta cttcgtcgt gattcgtgga attgtgaact cttttgigcc 2471  
 aaaaaaaaaa 2479  
 <210> 2  
 <211> 615  
 20    <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum cv Samsun NN  
 <400> 2  
 Met Met Met Phe Glu Glu Met Gly Phe Cys Gly Asp Leu Asp Phe Phe  
                     1                      5                      10                      15  
 25    Pro Ala Pro Leu Lys Glu Val Glu Thr Ala Ala Ser Gln Ile Glu Gln  
                     20                      25                      30



Glu Ser Glu Pro Val Met Asp Asp Asp Tyr Ser Asp Glu Glu Ile Asp  
                   35                                  40                                  45  
 Val Asp Glu Leu Glu Arg Arg Met Trp Arg Asp Lys Met Lys Leu Lys  
                   50                                  55                                  60  
 5 Arg Leu Lys Glu Met Thr Lys Gly Gly Lys Glu Gly Val Asp Ala Val  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Lys Gln Arg Gln Ser Gln Glu Gln Ala Arg Arg Lys Lys Met Ser Arg  
                                   85                                  90                                  95  
 Ala Gln Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Met Leu Lys Met Met Glu Val Cys  
 10                                  100                                  105                                  110  
 Lys Ala Gln Gly Phe Val Tyr Gly Ile Ile Pro Glu Lys Gly Lys Pro  
                   115                                  120                                  125  
 Val Thr Gly Ala Ser Asp Asn Leu Arg Glu Trp Trp Lys Asp Lys Val  
                   130                                  135                                  140  
 15 Arg Phe Asp Arg Asn Gly Pro Ala Ala Ile Ala Lys Tyr Gln Ala Asp  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Asn Ala Ile Pro Gly Lys Asn Glu Gly Ser Asn Pro Ile Gly Pro Thr  
                                   165                                  170                                  175  
 Pro His Thr Leu Gln Glu Leu Gln Asp Thr Thr Leu Gly Ser Leu Leu  
 20                                  180                                  185                                  190  
 Ser Ala Leu Met Gln His Cys Asp Pro Pro Gln Arg Arg Phe Pro Leu  
                   195                                  200                                  205  
 Glu Lys Gly Val Pro Pro Pro Trp Trp Pro Thr Gly Gln Glu Asp Trp  
                   210                                  215                                  220  
 25 Trp Pro Gln Leu Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gly Pro Pro Pro Tyr Lys  
                   225                                  230                                  235                                  240

Lys Pro His Asp Leu Lys Lys Ala Trp Lys Val Gly Val Leu Thr Ala  
                     245                    250                    255  
 Val Ile Lys His Met Ser Pro Asp Ile Ala Lys Ile Arg Lys Leu Val  
                     260                    265                    270  
 5 Arg Gln Ser Lys Cys Leu Gln Asp Lys Met Thr Ala Lys Glu Ser Ala  
                     275                    280                    285  
 Thr Trp Leu Ala Ile Ile Asn Gln Glu Glu Val Leu Ala Arg Glu Leu  
                     290                    295                    300  
 Tyr Pro Asp Arg Cys Pro Pro Leu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Gly Thr  
 10 305                    310                    315                    320  
 Phe Thr Met Asn Tyr Ser Ser Glu Tyr Asp Val Asp Gly Val Val Asp  
                     325                    330                    335  
 Glu Pro Asn Phe Asp Val Gln Glu Gln Lys Pro Asn His Leu Gly Leu  
                     340                    345                    350  
 15 Leu Met Tyr Val Asp Arg Phe Lys Glu Arg Leu Pro Met Gln Gln Gln  
                     355                    360                    365  
 Ser Leu Pro Ile Lys Asp Glu Ile Met Ile Ala Asn Leu Asp Phe Thr  
                     370                    375                    380  
 Arg Lys Arg Lys Pro Ala Asp Glu Leu Thr Phe Leu Met Asp Gln Lys  
 20 385                    390                    395                    400  
 Ile Tyr Thr Cys Glu Cys Leu Gln Cys Pro His Ser Glu Leu Arg Asn  
                     405                    410                    415  
 Gly Phe Gln Asp Arg Ser Ser Arg Asp Asn His Gln Leu Thr Cys Pro  
                     420                    425                    430  
 25 Phe Arg Asn Ser Pro Gln Phe Gly Val Ser Asn Phe His Val Asp Glu  
                     435                    440                    445

Val Lys Pro Val Val Phe Pro Gln Gln Tyr Val Gln Pro Lys Pro Ala  
450 455 460

Ser Leu Pro Ile Asn Gln Ala Pro Pro Ser Phe Asp Leu Ser Gly Ile  
465 470 475 480

5 Gly Val Pro Glu Asp Gly Gln Arg Met Ile Asn Glu Leu Met Ser Phe  
485 490 495

Tyr Asp Asn Asn Ile Gln Gly Asn Lys Ser Ser Met Ala Ala Asn Val  
500 505 510

Val Met Ser Lys Glu Gln Pro Arg Gln Gln Pro Ser Ile Gln Gln Asn  
10 515 520 525

Asn Tyr Leu His Asn Gln Gly Ile Ile Leu Asp Gly Asn Ile Phe Gly  
530 535 540

Asp Thr Asn Ile Ser Ala Asn His Ser Met Phe Pro Gln Gly Asp Arg  
545 550 555 560

15 Phe Asp Gln Ser Lys Val Leu Thr Ser Pro Phe Asn Ala Gly Ser Asn  
565 570 575

Asp Asn Phe His Phe Met Phe Gly Ser Pro Phe Asn Leu Gln Ser Thr  
580 585 590

Asp Tyr Thr Glu Ala Leu Ser Gly Ile Thr Gln Asp Asn Met Pro Lys  
20 595 600 605

Gln Asp Val Pro Val Trp Tyr  
610 615

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02347

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/63, C07K14/415 // C12N5/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/63, C07K14/415, C12N5/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GENESEQ/GenBank/DBJ/EMBL/PIR/Swiss-Prot

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cell, Vol. 89 (1997) Chao, Q. et al., "Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and a family of related proteins", p.1133-1144	1-13
Y	WO, 95/35318, A1 (Univ. Pennsylvania), 28 December, 1995 (28. 12. 95) & AU, 9528650, A & EP, 763060, A1 & US, 5650553, A	1-13
A	Plant Mol. Biol., Vol. 31 (1996) Maxon, J.M et al., "Cloning of a DNA-binding protein that interacts with the ethylene-responsive enhancer element of the carnation GST1 gene", p.751-759	14
A	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 90 (1993) Montgomery J. et al., "Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene", p.5939-5943	14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
7 September, 1999 (07. 09. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02347

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/63, C07K14/415//C12N5/14		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/63, C07K14/415, C12N5/14		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GENESEQ/GenBank/DBJ/EMBL/PIR/Swiss-Prot		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cell, Vol. 89(1997)Chao, Q. et al.; "Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and a family of related proteins", p. 1133-1144	1-13
Y	WO, 95/35318, A1 (Univ. Pennsylvania) 28. 12月. 1995 (28. 12. 95) & AU, 9528650, A & EP, 763060, A1 & US, 5650553, A	1-13
A	Plant Mol. Biol., Vol. 31(1996)Maxon, J. M et al.; "Cloning of a DNA-binding protein that interacts with the ethylene-responsive enhancer element of the carnation GST1 gene", p. 751-759	14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献		
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの		
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの		
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	31. 08. 99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 印
		4 B 9 4 5 2
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 90(1993)Montgomery J. et al; "Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene", p. 5939-5943	14